

ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE VĚD

FOLIA  
BIOLOGICA

TOMUS III

1957

FOLIA BIOLOGICA (PRAHA)

*Международное издание журналов Československá biologie и Československá mikrobiologie*

Редакционная коллегия:

Академик И. Малек (главный редактор), В. Вршанский, М. Гаšek, чл.-корр. ЧСАНФ, Герчик, академик О. Ировец, Ю. Мацура, академик С. Прат, Б. Росицкий (секр. ред. коллегии), Л. Черный, Я. Штерцль.

Переводы на русский язык: доц. д-р Широ́ва, на английский язык: д-р Ридесова, на немецкий язык: д-р Файгель

Издается Биологическим институтом Чехословацкой Академии наук в Издательстве ЧСАН. Выходит 6 раз в год. Подписная цена на 1 год Kčs 60.—, цена одного номера Kčs 10.—. Адрес редакции: Биологический институт ЧСАН, На цви́чишти 2, Прага XIX. Заказы: Артия, Сме́чки 30, Прага II, Чехословакия.

FOLIA BIOLOGICA (PRAHA)

*International Edition of the Journals Československá biologie and Československá mikrobiologie*

Editorial Board:

Academician I. Málek (Chief Editor), L. Černý, M. Hašek, Corresponding Member of the Czechoslovak Academy of Science F. Herčík, Academician O. Jírovec, J. Macura, Academician S. Prát, B. Rosický (Editorial Secretary), J. Šterzl, V. Vršanský.

Translations into Russian: Dr Schierová, into English: Dr Ridesová, into German: Dr Feigel.

Issued by Biologický ústav Československé akademie věd at Nakladatelství Čs. akademie věd. Yearly subscription (6 numbers) Kčs 60. Single number Kčs 10. Address: Biologický ústav ČSAV, Na evičišti 2, Praha XIX. Orders: Artia, Smečky 30, Praha II, Czechoslovakia.

FOLIA BIOLOGICA (PRAHA)

*Internationale Ausgabe der Zeitschriften Československá biologie und Československá mikrobiologie*

Redaktionsrat:

Akademienmitglied I. Málek (leitender Redakteur), L. Černý, M. Hašek, korresp. Mitgl. d. Čs. Akademie d. Wiss. F. Herčík, Akademienmitglied O. Jírovec, J. Macura, Akademienmitglied S. Prát, B. Rosický (Redaktions-Sekretär), J. Šterzl, V. Vršanský.

Die Übersetzungen besorgt Doz. Dr. A. Schierová für die russischen, Dr. A. Ridesová für die englischen und Dr. T. Feigel für die deutschen Artikel.

Herausgeber: Biologický ústav Československé akademie věd durch Vermittlung des Nakladatelství Čs. akademie věd, 6 Lieferungen jährlich. Abonnementpreis 60 Kčs, Preis der Einzelnummer 10 Kčs. Anschrift der Redaktion: Biologický ústav ČSAV, Na evičišti 2, Praha XIX. Zu beziehen durch: Artia, Smečky 30, Praha II, Československo.

## FOLIA BIOLOGICA

Tom. III. (1957) — Fasc. 1.

### The Production of Antibodies by Isolated Spleen Cells Following Contact with an Antigen in vitro

J. ŠTERZL

Institute of Biology, Czechoslovak Academy of Science, Department of Microbiology, Praha

Received September 19, 1956

The latest communications dealing with the possibility of antibody formation in tissue cultures to which an antigen has been added in vitro show that antibodies are not formed under these conditions (Parker 1937, Salle and McOmie 1937, Selmar 1944, Fastier 1948). Positive antibody formation in tissue cultures can be demonstrated only if the tissue used for culturing is taken from an animal which has been immunised in vivo (Meyer and Loewenthal 1927, Parker 1937, Fagraeus 1948a, Ranney and London 1951, Thorbecke and Keuning 1953, Tanaka 1953, Stavitsky 1955, Askonas and Humphrey 1955). These results give evidence, as concluded by Parker (1937), that the first phase of the reaction to an antigen takes place only under the conditions of the organism.

It was assumed by the author that the non-specific mobilisation reaction which occurs in the organism following administration of an antigen, directly participated in antibody formation. This reaction is displayed both in biochemical and physiological changes (changes in the blood sugar level, temperature, the number of leucocytes, etc.) and also in changes of a morphological character in the mesenchymal tissue (Fagraeus 1948b, Marshall and White 1950, Makinodan et al. 1954).

The present communication attempts to establish to what degree antibody formation is dependent on the non-specific metabolic and morphological reaction of the organism following administration of the antigen. The metabolic and morphological changes were produced by a different antigen (guinea-pig serum); after a given time (24 to 96 hours), the spleen was removed and the spleen cells isolated and mixed with the antigen (*Salmonella paratyphi B*) in vitro. The mixture of spleen cells and antigen was then administered intraperitoneally to young rabbits. These had already proved to be the best animals for the transfer of immunised tissues in previous experiments, as very young animals do not respond to an antigen by antibody formation (Šterzl 1955a). The same procedure was used with the controls, in which the spleen cells of a normal, non-immunised animal were mixed with the antigen.

#### Methods

A non-specific antigenic stimulus was produced by injecting rabbits (2–3 kg.) intravenously with 1 ml. guinea-pig serum 24–96 hours prior to killing, as described in the individual experiments.

The spleen of both immunised and normal rabbits was removed and prepared in a cooled room at 2° C. The cells were expressed from the spleen capsule into a chilled phosphate-physiological saline solution with 0.2% gelatine. The individual cells were freed by repeated sucking into a pipette. For further washing, which was carried out three times in the same solution, only a homogenous suspension of cells was used. The final dilution was made by adding 1 ml. of fluid (suspension of antigen, in the controls physiological saline) to 0.05 g. splenic tissue. In every experiment the number of cells was determined

in a Bürker chamber; a suspension of cells prepared in this way contained on an average  $30-40 \times 10^6$  lymphoid cells/1 ml.

The antigen used was a heat-inactivated suspension of *S. paratyphi B*. The quantitative inter-relationship of spleen cells and antigen was one of the decisive factors for the experiment and is given in the results. The mixture of spleen cells and antigen was incubated at  $37^\circ\text{C}$  and then injected intraperitoneally in doses of 1 ml. in 5-day-old rabbits. The incubation time varied in the different experiments and precise details are given in the tables; in most cases the time of mixing was 10 minutes.

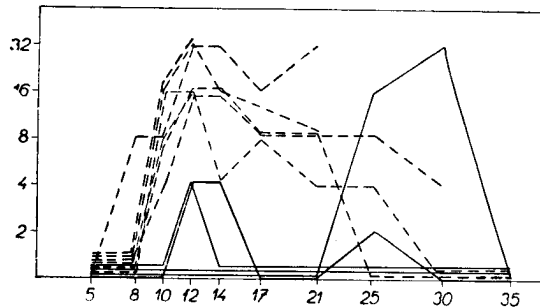


Fig. 1. Transfer of spleen cells of normal rabbit ( $40 \times 10^6$  cells/1 ml.) to two groups of young rabbits; mixed for 10 minutes: a) dashed — with antigen *S. paratyphi B* in concentration of  $100 \times 10^6$  microorganisms/1 ml., b) full — with antigen  $500 \times 10^6$  micro-organisms/1 ml. x: age of rabbits in days; days on which blood collected denoted. y: titre of agglutinating antibodies.

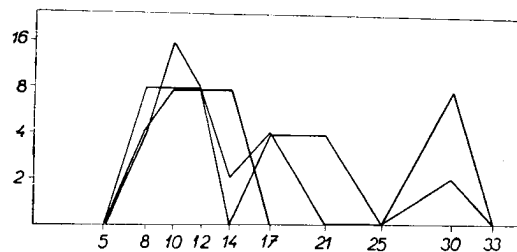


Fig. 2. Isolated spleen cells ( $32 \times 10^6$ /1 ml.) of rabbit immunised intravenously 24 hours previously with 1 ml. guinea-pig serum. The cells were mixed in vitro with the antigen ( $10^8$  micro-organisms/1 ml.) for 10 minutes. x and y: as in tab. 1.

Antibody formation was found after mixing the antigen (*S. paratyphi B*.) with spleen cells isolated from animals following non-specific stimulation with guinea-pig serum. The experiments were carried out in 60 young rabbits from 10 litters. In all groups where there had been antigenic stimulation by the administration of a foreign serum 24—96 hours before removal of the spleen, followed by mixture of the spleen cells with the antigen (*S. paratyphi B*) in vitro, antibodies which agglutinated the specific antigen were found within a few days following intraperitoneal transfer to young rabbits (fig. 2 and 3). No substantial increase in antibody formation was found even when the cells were isolated from the spleen of an animal which had

The times at which blood was collected from the young rabbits by cardiac puncture are also given in the tables. After collection, the sera were stored at  $-15^\circ\text{C}$  and agglutination was carried out in every group at the same time. In cases where it was necessary to remove lipoid substances, the sera were shaken out with chloroform (Šterzl 1955). The agglutination specimens were stored in a refrigerator and the results read off after 4, 6 and 8 days.

The cells were irradiated in a dish placed in ice, in a layer not exceeding 1 mm. Irradiation was carried out using a Mikrometa apparatus (AEG — 50-X-ray tube) under the following conditions: focal distance 10 cm., Al 0.1, KV 50, mA 6. With these constants the concentration of irradiation is 430 r/10 seconds.

## Results

In the first experiments (Šterzl 1955), in which the cells of a normal animal were mixed with an antigen and transferred intraperitoneally to young rabbits, no antibody formation was found. In these experiments the amount of antigen used was  $10^9$  bacterial cells in 1 ml. On reducing the amount of antigen added to the cells in vitro, conclusive evidence of antibody formation was found after a transfer to young rabbits. The optimal relationship between antigen and cells was therefore investigated. The results obtained hitherto show that the most satisfactory proportion is 1—2 micro-organisms to one spleen cell. A higher concentration of the antigen inhibits antibody formation (fig. 1).

been immunised over a period of 14 days with five doses of guinea-pig serum (fig. 4). This finding is of interest in view of the fact that during the first days after non-specific immunisation an increasingly marked morphological reaction took place in the spleen tissue in all experiments (an increase in the number of reticular cells, plasmoblasts and plasmocytes and a transitory decrease in the lymphocytes — Holub 1957). Antibody formation was also demonstrated in experiments in which spleen cells were isolated from an organism immunised in vivo with the specific antigen (*S. paratyphi B*) and mixed with the antigen in vitro (fig. 5).

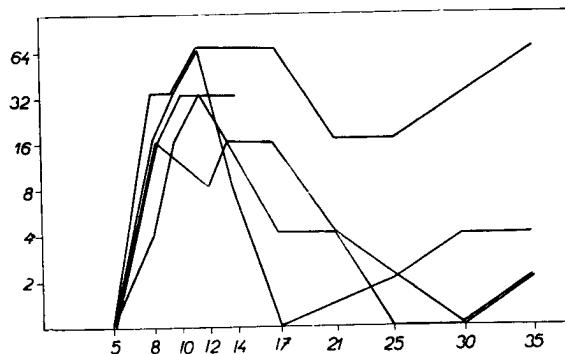


Fig. 3. Isolated spleen cells ( $41 \times 10^6/1$  ml.) of rabbit immunised intravenously 72 hours previously with 1 ml. guinea-pig serum. Incubated in vitro with antigen ( $10^8$  micro-organisms/1 ml.) for 10 minutes and transferred intraperitoneally to group of young rabbits.  $x$  and  $y$ : as in tab. 1.

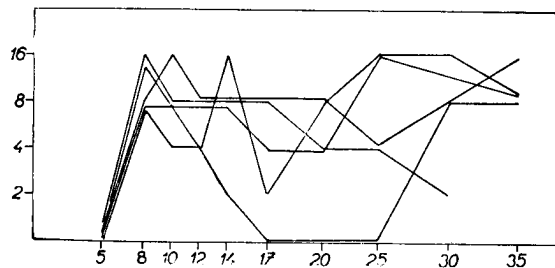


Fig. 4. Spleen cells were isolated from the spleen of rabbit No. 43 ( $35 \times 10^6/1$  ml.), which had been immunised over a period of 14 days with five intravenous doses of 1 ml. guinea-pig serum. These were mixed for 10 minutes in vitro with the antigen  $10^8$  micro-organisms/1 ml.) and after incubation were transferred intraperitoneally to a group of young rabbits.

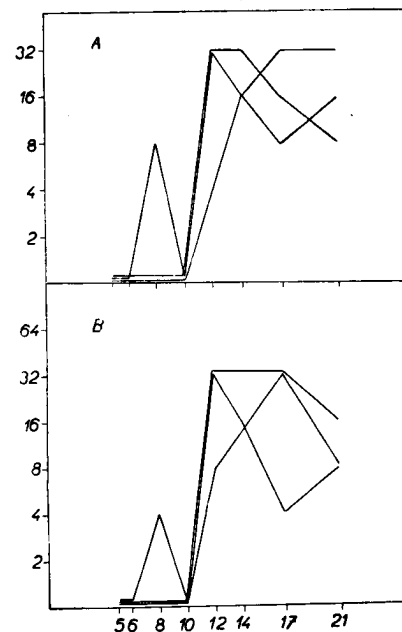


Fig 5. Isolated spleen cells ( $45 \times 10^6/1$  ml.) from two rabbits immunised intravenously 72 hours previously with 1 ml. antigen *S. paratyphi B* ( $10^8$  micro-organisms). Half the cells transferred to young rabbits A) only washed in physiological saline, B) incubated, after washing, with antigen for 10 minutes ( $10^8$  micro-organisms/1 ml.).  $x$  and  $y$ : as in tab. 1.

In further experiments carried out in eight groups of young rabbits, spleen cells from normal animals which were mixed with the optimal amount of antigen were transferred to the young animals. In all these experiments also there was clear evidence of the formation of agglutinating antibodies (fig. 6).

Since spleen cells prepared in the same way and mixed with the optimal amount of antigen did not form antibodies when cultured in tissue cultures (Rychlíková and Šterzl 1957), it was necessary to consider whether the young rabbits did not participate actively in the formation of antibodies. It was demonstrated, however

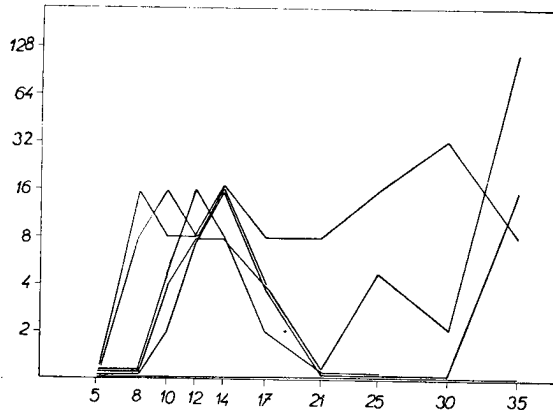


Fig. 6. Isolated cells from normal rabbit ( $44 \times 10^6/1$  ml.), mixed with antigen ( $10^8/1$  ml.) for 10 minutes.  $x$  and  $y$ : as in tab. 1.

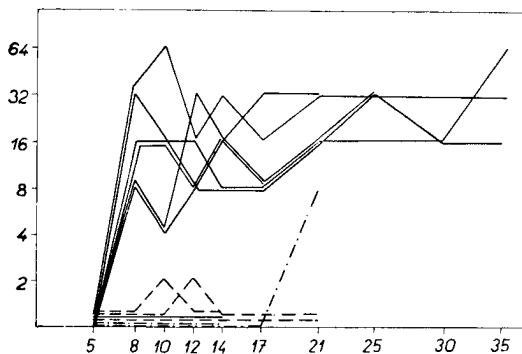


Fig. 7. Isolated spleen cells of normal rabbit ( $39 \times 10^6/1$  ml.) and irradiated with 860 r (full), 1,000 r (dashed) and 1,200 r (dash and dot), then mixed with antigen ( $10^8$  micro-organisms/1 ml.) for 10 minutes and injected intraperitoneally in young rabbits.  $x$  and  $y$ : as in tab. 1.

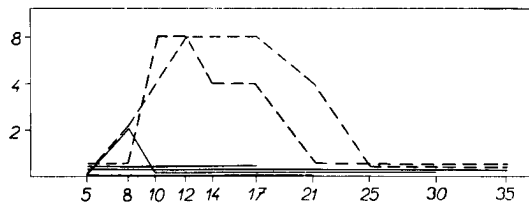


Fig. 8. Isolated spleen cells ( $43 \times 10^6/1$  ml.). Half the cells not irradiated (dashed line), half irradiated with 1,200 r (full line). After 4 hours incubation at  $37^\circ\text{C}$  mixed with antigen ( $10^8$  micro-organisms) and injected intraperitoneally in young rabbits.

in eight groups (55 animals) that if the isolated cells are irradiated, antibodies were formed only in those animals to which cells not damaged by irradiation had been administered. The cells which go on to form antibodies are either those which have received only small doses of irradiation (fig. 7) or non-irradiated cells (fig. 8). Doses of 1,000 and 1,200 r completely inhibit antibody formation.

The possibility of the active participation of the young animals in antibody formation is likewise not supported by the following finding: After transfer of the cells, an initial phase of rapid development of antibodies occurs, which can be inhibited by irradiating the cells. The second phase of the antibody reaction is the active response of the young animals to the antigen which is transferred together with the cells, and coincides chronologically with the development of antibodies which takes place when only the antigen is administered to young animals (20th—30th day of life). In the transfer of cells together with the antigen, therefore, the question is not one of induction of the active response of the young animals to the antigen, as in that case active antibody formation would have to commence shortly after transfer of the cells. Nor could it be demonstrated that the administration of a foreign antigen in any way accelerated the response of the young animals to the antigen. This was demonstrated by an experiment in which a different antigen (guinea-pig serum) was first injected and the antigen *S. paratyphi B.* was injected seven days later. The formation of antibodies was in no way speeded up following this measure, as compared with the controls (fig. 9). The author regards the organism of the young rabbits to which the spleen cells are transferred, together with the antigen, as passive, as a suitable culture medium encouraging the development of the cells and their complex biochemical processes which participate in the formation of the antibodies.

It was also wished to determine whether active processes take place in spleen cells in the course of short-term incubation of the antigen with the cells in vitro. It is possible that the antigen and spleen cells are simply transferred into a suitable environment and that the actual reaction of antibody formation takes place only within the young animal. There is evidence for this possibility in the fact that if spleen cells from a normal adult rabbit were injected in young rabbits and the antigen was not injected until 24, 48 and 72 hours later (intraperitoneally), an antibody reaction also occurred (fig. 10). This would indicate that the transferred spleen cells survive in the young rabbit and that contact of the antigen with them is also possible in vivo. Antibody formation was also demonstrated in cases in which the spleen cells were first injected intraperitoneally and the antigen was then injected into the blood stream (intracardially — fig. 11). This experiment also indicates that cells transferred intraperitoneally do not remain only locally, but that they find their way into the internal organs of the animal, as demonstrated by Holub (1957).

An attempt was made to demonstrate the significance of the time for which the cells are in contact with the antigen in vitro by washing out the antigen after incu-

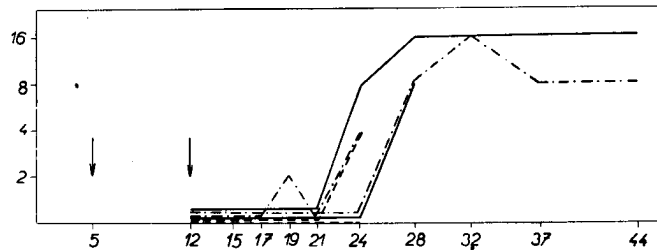


Fig. 9. From a group of six young rabbits, four injected on the fifth day of life with guinea-pig serum. Dash-dot: 2 ml. guinea-pig serum intraperitoneally. Dashed: 3 ml. guinea-pig serum. Full: controls without serum. Antigen ( $10^8$  micro-organisms/1 ml.) administered by intracardiac injection on 12th day of life.  $x$  and  $y$ : as in tab. 1.

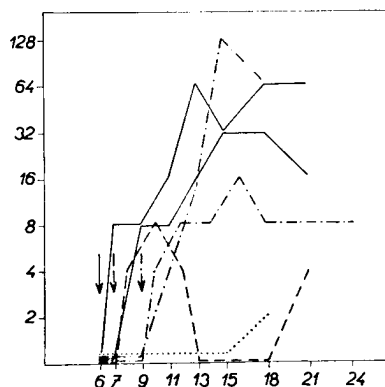


Fig. 10. Isolated spleen cells ( $28 \times 10^6$ /1 ml.) injected intraperitoneally in young rabbits. Full: cells mixed immediately with 1 ml. antigen. Dashed: 1 ml. antigen injected intraperitoneally 24 hours after injection of spleen cells. Dash-dot: 1 ml. antigen injected intraperitoneally 72 hours after injections of spleen cells. Dotted: spleen cells killed by heating to  $56^\circ \text{C}$  for 30 minutes and injected in young rabbits after being mixed with antigen. Concentration of antigen:  $10^8$  micro-organisms/ 1 ml.  $x$  and  $y$ : as in tab. 1

bation together with the cells in vitro. In these experiments the cells were transferred to four groups of young animals (21 in all). It was seen that washing out of the superfluous antigen did not destroy the ability of the transferred cells to form antibodies (fig. 12). The amount of antigen remaining in the cells was determined, following destruction of the cells by freezing and thawing, by immunising adult animals. In adult animals the amount of antigen added to the cells ( $10^8$  micro-organisms) gives an antibody titre of 1 : 512—1,024. Following immunisation with destroyed cells, the antibody titre in rabbits averaged 1 : 32—64. Cells were trans-

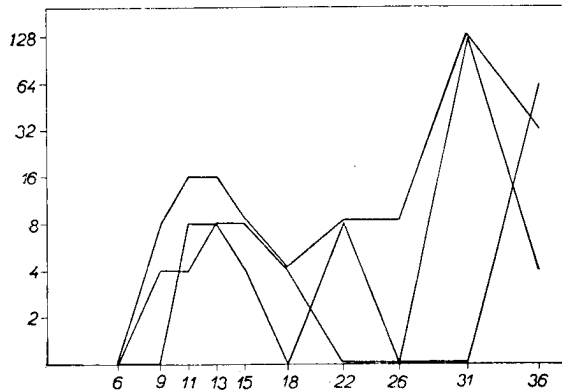


Fig. 11. Isolated spleen cells of rabbit immunised 72 hours previously with guinea-pig serum. After washing, the cells were suspended in physiological saline ( $35 \times 10^6$  micro-organisms/1 ml.) and 1 ml. injected intraperitoneally. The antigen ( $10^8$  micro-organisms) was then injected into the blood stream by the intracardiac route.  $x$  and  $y$ : as in tab. 1.

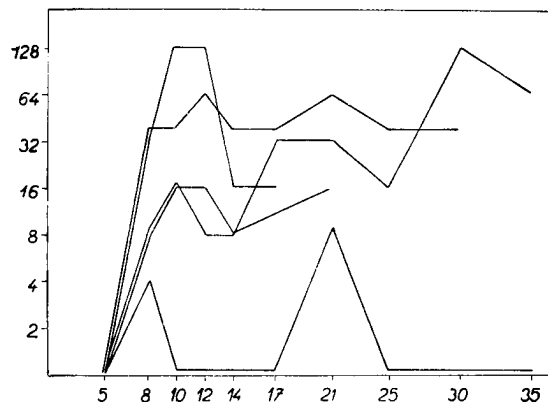


Fig. 12. Spleen cells isolated from normal rabbit ( $39 \times 10^6$  micro-organisms/1 ml.) incubated together with antigen ( $10^8$  micro-organisms/1 ml.) for two hours at  $37^\circ \text{C}$ . After incubation superfluous antigen washed out with gelat. physiological saline and cells injected intraperitoneally in doses of 1 ml. in group of young rabbits. Part of the cells destroyed by freezing and thawing to determine the amount of antigen in the cells.  $x$  and  $y$ : as in tab. 1.

the cells with the antigen in vitro and transferring the mixture to animals irradiated with X-rays. They obtained positive results only when the animals had been immunised in vivo. Our results do not confirm their findings. In our view, the main cause of their negative results is the use of a protein antigen, as the demonstration of formed antibodies by precipitation is not a very sensitive method.

The main question is whether the formation of antibodies in a transfer of a mixture of cells and antigen to young rabbits is not due to an active reaction on the part of

ferred to two groups of young rabbits (13 in all); half of these cells had been incubated, together with the antigen, in a thermostat and half in a refrigerator. Following incubation the cells were washed and it was found that the cells incubated together with the antigen in the refrigerator did not form antibodies. Although it is not possible to conclude from these experiments that the initial biochemical processes of antibody formation take place already in vitro, the results permit the conclusion that in vitro the cells bind the effective amount of antigen, which is only part of the total amount added.

#### Discussion

Antibody formation was obtained on isolated spleen cells by mixing them in the optimal proportion with the antigen in vitro and transferring them after incubation intraperitoneally to young rabbits. At the time of our first communication on the successful formation of antibodies by isolated spleen cells (Šterzl and Hruběšová 1955b), an extensive work by Harris et al. was published (1955), preceded by a preliminary communication (1954). Harris et al. succeeded in obtaining antibody formation on isolated cells of the lymphatic glands, mixed with an antigen and transferred to animals which had undergone X-ray irradiation. Although a different form of experiment and a different antigen were used, the results are basically the same. Roberts and Dixon on the other hand (1955), were unable to demonstrate antibodies by mixing



the recipients. It was demonstrated that disorganisation of the vital processes of the transferred cells—e. g. by irradiation—destroys the possibility of antibody formation after their transfer to the young animals. This does not, of course, exclude the possibility that irradiation destroys cell structures—e. g. mitochondria—which, when transferred to young animals, induce a metabolic change which makes the active reaction of the animals to the transferred antigen possible. This possibility is not supported, however, by a further finding. Following transfer of the cells, antibodies are formed in two chronologically separate phases. The first of these depends on the function of the spleen cells, while the second is the actual active response of the young rabbit to the antigen injected together with the cells. In the experimental part it was shown that the active response is not speeded up in any way as compared with injection of the antigen alone. If induction of a metabolic state occurred, making a reaction to the antigen possible, then the persistent antibody level characteristic of active formation would be determined as the first response, and not the typical curve of passive transfer. We regard the participation of the young organism in the whole reaction as passive and simply as a suitable medium for maintaining viability of the transferred cells and for the biochemical processes essential in antibody formation.

Although in experiments with Rychlíková (1957) we were not successful in demonstrating antibody formation in tissue culture, after the addition of antigen to explanted tissue, it is concluded from these experiments that the chief difference as compared with transfers to young rabbits lies in inadequate nutritional conditions in the tissue cultures. We believe that improvement of the culture medium in tissue cultures and dynamic conditions of cultivation will produce the same result—i. e. antibody formation— as in a transfer to young rabbits.

It also remains to be explained why antibody formation by transferred cells is of relatively short duration. Why does antibody formation decrease at a time when, as has been demonstrated, the transferred cells still survive in the organism of the young animal? It is possible that further generations of cells, which do not come into contact with the antigen, do not form antibodies and that the metabolic change (the production of antibodies) is not inherited by further generations of cells. In this association it should also be borne in mind that this may be the manifestation of a transplantation immunity response on the part of the recipient. Further experiments are being carried out in an attempt to determine the basis of this phenomenon.

The finding that antibodies can be produced by isolated cells under suitable conditions provides an answer to a number of questions. It defines the importance of neurohumoral factors, primarily in the formation of the most suitable metabolic conditions of the environment and of the metabolic level of the cells. On the other hand, these experiments exclude the direct causal participation of nervous factors and others in antibody formation. They are also an experimental reply to present discussion on the significance of reflex processes for the formation of antibodies. The finding of antibody formation in isolated cells permits attention to be concentrated on the stage of their development in which antibodies cannot be demonstrated serologically either in cells or in serum. We are now embarking on these investigations by studying metabolic changes which take place following contact between antigen and cells and by studying the influence of antimetabolites and radiation on the antibody reaction at cell level. At the same time the question arises as to whether it will prove possible to bring about antibody formation following the mixing of cell particles with the antigen *in vitro*. We raise this question because antibody formation was transferred from immunised animals to young rabbits by isolated mitochondria (Šterzl and Hrubešová 1955a).

### Summary

Cells isolated from the spleen of an adult rabbit and mixed with an antigen in vitro (*S. paratyphi B.*) form antibodies when injected intraperitoneally in 5-day-old rabbits. At that age young rabbits do not respond to the transferred antigen by antibody formation.

No differences were found in the degree of formation, whether the young rabbits were injected with the cells of a normal rabbit, the spleen cells of a rabbit immunised with a non-specific antigen (guinea-pig serum) or with the specific antigen (*S. paratyphi B.*), after mixing with the antigen.

Antibody formation takes place in the presence of the optimal quantitative relationship when mixing the cells and antigen in vitro. In a corpuscular antigen, two micro-organisms of *S. paratyphi B* are added to one spleen cell. Larger doses of the antigen inhibit antibody formation.

If isolated cells are irradiated, a dose of 860 r does not inhibit antibody formation, while doses of 1,000—1,200 completely inhibit it. The transferred spleen cells of an adult rabbit do not induce an active response to the antigen in young rabbits. The participation of the recipient (the young rabbit) in antibody formation is regarded as passive, i. e. the animal is regarded as a suitable culture medium for the transferred cells.

Cells injected into the organism survive; antibody formation can be evoked by the injection of the antigen in young rabbits 24 and 72 hours after the injection of washed spleen cells alone. Antibodies are also formed if the cells are injected intraperitoneally and the antigen is injected into the blood stream.

On mixing the cells with the antigen at 37 °C, the effective amount of antigen is rapidly bound by the cells. The washing out of superfluous antigen following incubation does not prevent the formation of antibodies.

### References

- Askonas, B. A., Humphrey, J. H.: Antibody Formation in Slices of Granulomata Produced by Adjuvant. *Biochem. J.* 60 : X, 1955.
- Fagraeus, A.: The Plasma Cellular Reaction and its Relation to the Formation of Antibodies in vitro. *J. Immunol.* 58 : 1, 1948a.
- Fagraeus, A.: Antibody Production in Relation to the Development of Plasma Cells. *Acta med. scand. Suppl.* 204, 1948b.
- Fastier, L. B.: An Attempt to Produce Bacterial Agglutinins in vitro. *J. Immunol.* 60 : 399, 1948.
- Harris, S., Harris, F. N.: Studies on the Transfer of Lymph Node Cells. V. Transfer of Cells Incubated in vitro with Suspensions of *Shig. paradysenteriae*. *J. Immunol.* 74 : 318, 1955.
- Holub, M.: Kvantitativní změny lymfatické tkáně během imunitace. *Čs. morfologie* 5 1957.
- Makinodan, T., Rush, R. F., Wolfe, H. R.: Precipitin Production in Chickens. X. Cellular Changes in the Spleen During Antibody Production. *J. Immunol.* 72 : 39, 1954.
- Marshall, A. H. A., White, R. G.: Reaction of the Reticular Tissue to Antigens. *Brit. J. Exp. Pathol.* 31 : 157, 1950.
- Meyer, K., Loewenthal, H.: Untersuchungen über Anaphylaxie an Gewebekulturen. *Zschr. Immunitätsforsch.* 54 : 420, 1927.
- Parker, R. C.: Studies on the Production of Antibodies in vitro. *Science* 85 : 292, 1937.
- Roberts, J. C., Dixon, J. F.: The Transfer of Lymph Node Cells in the Study of the Immune Response to Foreign Proteins. *J. Exp. Med.* 102 : 379, 1955.
- Rychlíková, M., Šterzl, J.: Pokusy o tvorbu protilátek v tkáňové kultuře. *Čs. biologie*, 6, 1957 (in press).
- Raney, H. M., London, M.: Antibody Formation in Surviving Tissues. *Fed. Proc.* 10 : 562, 1951.
- Salle, A. J., McOmie, W. A.: Immunological Responses of Tissues Cultivated in vitro. *J. Immunol.* 32 : 157, 1937.

- Selmar, E.: On the Formation of Bacterial Antibodies in Tissue Cultures. Acta patho . microbiol. scand. 21 : 517, 1944.
- Stavitsky, A. B.: In vitro Production of Diphtheria Antitoxin by Tissues of Immunized Animals. I. Procedure and Evidence for General Nature of Phenomenon. J. Immunol. 75:214, 1955.
- Šterzl, J.: Průkaz a biologické vlastnosti prekursoru serových protilátek. Čs. biologie 4 : 321, 1955.
- Šterzl, J.: The Demonstration and Biological Properties of the Tissue Precursor of Serum Antibodies. Fol. biol. (Praha) 1 : 193, 1955.
- Šterzl, J., Hrubešová, M.: Přenos tvorby protilátek nukleoproteidovými frakcemi na neimunizované příjemce. Čs. biologie 4 : 600, 1955.
- Šterzl, J., Hrubešová, M.: The Transfer of Antibody Formation by Means of Nucleoprotein Fractions to Non-immunized Recipients. Fol. biol. (Praha) 2 : 21, 1956a.
- Šterzl, J., Hrubešová, M.: Tvorba protilátek — model adaptivní proteosynthesy. Sjezd o bílkovinách 1. 12. 1955b. Čs. gastroenterol. 10 : 228, 1956b.
- Tanaka, A. H.: Studies of Antibody-producing Cells. II. The Agglutinin Formation in the Bone-marrow of Rabbits. Jap. Journ. Bact. 8 : 193, 1953.
- Thorbecke, G. J., Keuning, F. J.: Antibody Formation in vitro by Haemopoietic Organs after Subcutaneous and Intravenous Immunization. J. Immunol. 70 : 129, 1953

## Образование антител изолированными клетками селезенки после смешения с антигеном in vitro

Я. ШТЕРЦЛЬ

### Резюме

Клетки, изолированные из селезенки взрослого кролика и смешанные с антигеном in vitro (*S. paratyphi B*) образуют антитела при впрыскивании в полость брюшины 5-дневным кроликам. В этом возрасте крольчата не реагируют на введение антигена образованием антител.

Не наблюдалось различий в образовании антител в случаях, когда крольчатам вводились после их смешения с антигеном: клетки нормального кролика, клетки из селезенки кролика, иммунизированного неспецифическим антигеном (сывороткой морской свинки) или же специфическим антигеном (*S. paratyphi B*).

Образование антител обусловлено оптимальным количественным соотношением смеси клеток и антигена in vitro. У корпускулярного антигена мы на 1 клетку селезенки прибавляем 2 микробов *S. paratyphi B*. Более значительные дозы антигена подавляют образование антител.

Если изолированные клетки облучаются 860 г, это не подавляет образования антител. Облучение клеток 1000—1200 г нарушает образование антител. Перенесение клеток селезенки взрослого кролика не вызывает активной реакции на антиген у крольчат. Мы рассматриваем участие реципиента (молодого животного) в образовании антител как пассивное, — как участие благоприятной культивационной среды для переносимых клеток.

Введенные в организм клетки выживают: образование антител можно вызвать путем впрыскивания молодым животным антигена через 24 и 72 часа после введения только промытых клеток селезенки. Антитела образуются и тогда, если клетки вводят в полость брюшины, а антиген — в кровяное русло.

При смешивании клеток с антигеном при 37° C связывание эффективного количества антигена клетками происходит быстро. Вымывание остатков антигена после инкубации не нарушает образования антител.

## FOLIA BIOLOGICA

*Tom. III. (1957) — Fasc. 1.*

### The Significance of Staphylococcal $\alpha$ toxin and Leucocidin

J. JOHANOVSKÝ

Institute of Biology, Czechoslovak Academy of Science, Department of Microbiology, Praha

*Received October 12, 1956*

Staphylococcal  $\alpha$  toxin is almost universally held to be the main factor of the pathogenicity of staphylococci. This view is based on the similarity of pathological changes evoked by the injection of toxin and of a living culture in experimental animals (Burnet 1929), on the relationship between the formation of toxin and of the pathogenicity for experimental animals (Christie, North and Parlin 1946, Selbie and Simon 1952), on the parallelism of antitoxic immunity and resistance to experimental infection (Ramon et al. 1936, Downie 1937) and on the presence of  $\alpha$  toxin in the large majority of pathogenic staphylococci of human origin (Schwabacher et al. 1945, Marks 1952). In the preparation of staphylococcal anatoxin, the strains, culture media and purification methods are also selected on the basis of the formation of  $\alpha$  toxin (Ramon 1950, Vygodchikov 1950, Wittler and Pillemer 1948, Turpin et al. 1954).

It is a striking fact, however, that staphylococcal  $\alpha$  toxin haemolyses the erythrocytes and kills the leucocytes of various experimental animals, but not those of man, or only to a very slight degree. Great interest was therefore roused by the discovery of staphylococcal leucocidin, which differs from  $\alpha$  toxin and is specific for human leucocytes (Panton and Valentine 1932, Valentine 1936, Proom 1937).

An analysis of strains and antibody responses in a somewhat small number of patients showed a closer relationship between the degree of severity of staphylococcal infection and the formation of specific leucocidin than the formation of  $\alpha$  toxin and that resistance is associated rather with the presence of antileucocidin than of antitoxin.

The work since the communications of Valentine and Butler (1939) has neither been repeated nor verified. This is partly due to the difficult and tedious method used for demonstrating specific staphylococcal leucocidin, which consists in the microscopic evaluation of the damage done to the leucocytes.

A method has been elaborated in our laboratory for the easy demonstration of staphylococcal leucocidin, similar to that for differentiating live and dead bacteria by staining (Málek 1954). The quantitative production of toxin and of specific leucocidin was determined in several hundred staphylococcal strains of varying origin and a comparison made with the pathological process.

#### *Materials and Methods*

Most of the staphylococcal strains were obtained from routine diagnostic laboratories. All the strains formed coagulase and agglutinated plasma on a slide. Coagulase negative strains do not form leucocidin.

Toxin and leucocidin were obtained by the cellophane method (Johanovský 1956). A series of parallel and repeated production confirmed that this method gives even results in the same strain, with only slight fluctuation in the titres.

Specific leucocidin was titrated in the following manner: the same volume (0.1 ml.) of human blood cells, collected into diluted heparin and washed three times in Tyrode solution, was added to different dilutions of toxin (1 : 4—1 : 512). After on hour's incubation in a thermostat, 0.1 ml. of 1% Congo red was added and after three minutes the same amount of 0.2% Nile blue. The blood was examined without fixation with an objective No. 20 or 45. Live leucocytes are stained pale blue, dead leucocytes reddish brown; with high concentrations of toxin the leucocytes disappear completely. The living and dead leucocytes are always counted until an absolutely clear result has been obtained in a given specimen. As a rule, two counts are sufficient, with determination of 20—25 leucocytes, as the limits of titration are fairly well defined. A dilution in which most or all of the leucocytes have been killed is regarded as a titre of leucocidin. Control preparations show over 90% living elements.

This method was tested for reliability and a quantitative comparison made with other methods for determining the state of the leucocytes. In 120 titrations carried out in 25 specimens, concurring results, or results differing only within the limits of one degree of dilution were obtained in 96%. This method was also compared with determination of the vitality of leucocytes by means of a change in reduction capacity (Jensen and Maaloe 1950), supravital staining of the nuclei (Kredel and Sant 1936) and staining with methylene blue (Říman 1957). It was established quantitatively that on using this method the same titres of leucocidin were found as on using the method of microscopic evaluation (Panton and Valentine 1932) and determination of the vitality of leucocytes according to their phagocytic capacity (Puchkov and Titova 1952).

Antibodies against specific leucocidin were determined as the dilution of serum neutralising a working dose of leucocidin. Antigenic potency was determined in vitro according to the ability of the antigen to become bound to the corresponding antibody and in vivo according to the development of antileucocidin, as in the previous work with  $\alpha$  toxin (Johanovský 1956). Titration of  $\alpha$  toxin and antitoxin was carried out by the usual haemolytic method in rabbit blood cells.

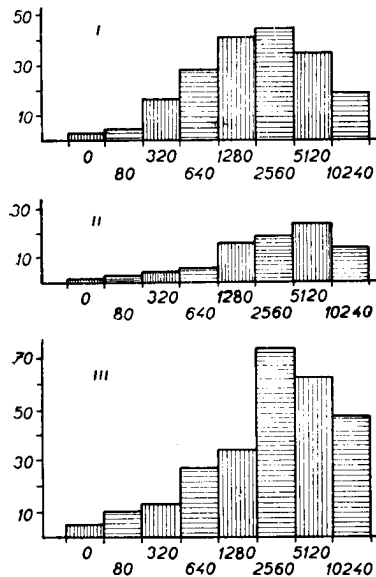


Fig. 1. Titre of  $\alpha$  toxin in strains of varying origin: I. from pathological material, II. from the throat and nose of patients with staphylococcal infection, III. from healthy subjects. x: titre of toxin, y: number of cases.

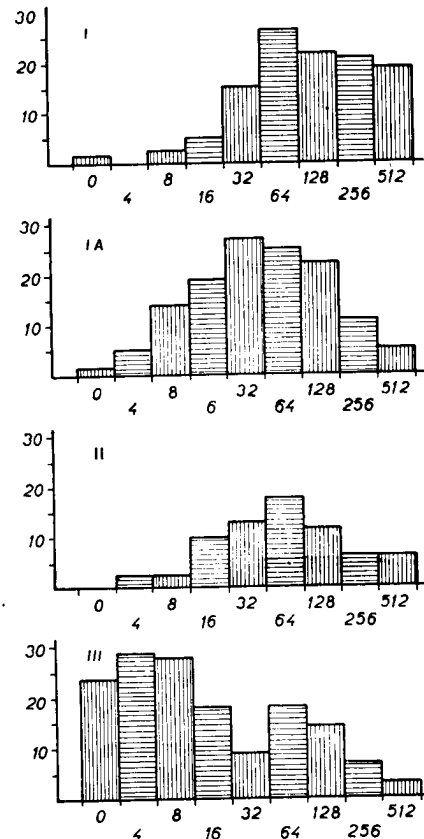


Fig. 2. Titre of specific leucocidin in staphylococcal strains of varying origin: I. from pathological material, IA from surface pathological processes, II. from the throat and nose of patients with staphylococcal infection, III. from healthy subjects. x: titre of leucocidin, y: number of cases.

### Results

In staphylococcal strains which produced coagulase, ability to form  $\alpha$  toxin and specific leucocidin was subjected to a detailed quantitative analysis. The strains were classified in a number of groups according to their origin: I. Strains isolated directly from a pathological process, II. Strains from patients with a staphylococcal infection but not from pathological foci (isolated from nose and throat), III. Strains from the nose and throat of subjects without manifest staphylococcal infection. The result of this comparison is shown in fig. 1, with reference to the production of  $\alpha$  toxin in a total of 542 strains. The graph shows the number of strains in every group which attained the given titre of  $\alpha$  toxin. It shows that there is no difference between the groups in the distribution of toxigenicity of the strains; on the contrary, it would appear that strains from pathological material produce rather less toxin.

The results of determination of specific leucocidin in 476 strains is shown in fig. 2. For the sake of greater clarity, the strains from pathological material have been divided into two groups, one from more severe processes (mastitis, phlegmon, otitis, etc.), the other from surface processes (suppurating wounds, eczema, etc.). In these an evident relationship was seen. The majority of strains from pathological processes and patients with staphylococcal infections produce a considerable amount of leucocidin, whereas the majority of strains from normal subjects produce very little leucocidin.

A still more convincing result was obtained on dividing the strains from pathological material into groups, according to the individual morbid processes (tab. 1). The relationship between the severity of the process and the titre of leucocidin is marked. For example, there are statistically significant differences between groups of strains from mastitis, abscesses and eczema ( $P < 0.001$ ), strains from furunculosis

Table 1. Titres of Specific Leucocidin in Staphylococcal Strains Isolated From Various Pathological Processes

Condition	No. of cases	Average titre of leucocidin	No. of cases with titre			
			0—16	32—64	128—256	256
Osteomyelitis, pyelonephritis with metastases	5	294	—	—	2	3
Otitis	11	164	—	5	3	3
Tonsillitis	5	147	—	1	4	—
Mastitis	20	130	1	6	9	4
Phlegmon	7	128	1	1	3	2
Panaritium	4	128	—	1	3	—
Furunculosis	23	90	3	8	9	3
Puerperal subfebrility	60	64	12	19	21	8
Pemphigus neonatorum	9	55	1	6	2	—
Abscess, secondary supuration	53	46	13	29	7	4
Eczema	41	37	12	20	9	—
Afebrile puerperium	52	11.5	38	9	5	1
Throat and nose of healthy subjects	146	12	98	24	21	3

and eczema ( $P < 0.01$ ) and strains from eczema and from the throat and nose of normal subjects ( $P < 0.001$ ), etc. Particular attention should be paid to the eighth and penultimate groups; these are staphylococci cultured from the vagina in the first days after delivery and are divided into two groups according to whether a postpartal subfebrile condition of staphylococcal origin did, or did not, develop (Šebek, Schubert and Johanovský 1957). It is evident that precisely those strains which are capable of producing leucocidin evoked infection of the genital tract with a febrile course ( $P < 0.001$ ).

Fig. 3 gives the collective results for all strains isolated from patients with staphylococcal infection and from healthy subjects. The typical course of the two-peak curve in strains from healthy subjects shows that the material is not homogenous. Staphylococci from healthy subjects have a leucocidin titre  $< 1 : 16$  in more than two-thirds of the cases, while the curve from the other strains shows the same course as that of the strains isolated from pathological material, with the maximum titre between  $1 : 64$  and  $1 : 128$ .

The results justify the view being taken that specific leucocidin plays an appreciable role in the pathogenesis of staphylococcal infections. We have therefore dealt with it from the aspect of the preparation of toxoid. A brief account of the results so far obtained is given below.

It was confirmed that specific leucocidin can be produced in semi-solid media of varying composition, but higher titres (sometimes decuple) were obtained with production on cellophane (Johanovský 1956). Leucocidin is an antigenic substance; it can be detoxicated with formol under similar conditions as with  $\alpha$  toxin. With suitable detoxication (0.2—0.3% formol after several days), antigenic loss does not occur.

In immunisation in rabbits, following several injections of toxoid prepared from strains with a high titre of leucocidin, antibodies develop which neutralise several dozen to several hundred minimal doses of leucocidin. Varying amounts of antibodies are also found together with antitoxins in the blood of patients with staphylococcal infections or who are convalescing from such infections. Antileucocidins and antitoxins do not influence one another in their action on corresponding toxins. In the absence of a standard serum it is suggested that the amount of antibodies required to neutralise 100 minimal doses of leucocidin should be taken as one unit of antileucocidin.

### Discussion

The results show an unequivocal and statistically significant difference between the titres of leucocidin in staphylococcal strains from normal human carriers and strains from morbid processes. Elevated titres of leucocidin are also found in strains from the throat and nose of patients with a staphylococcal infection; of these, it is

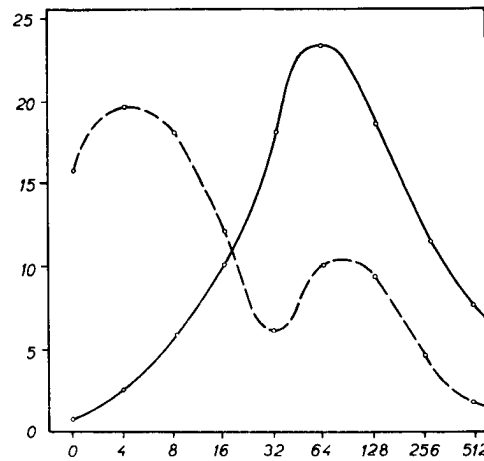


Fig. 3. Titres of specific leucocidin in staphylococcal strains isolated from patients with staphylococcal infection and from healthy subjects. Strains from patients: full line. Strains from healthy subjects: dashed line x: titre of leucocidin, y: number of cases in %.

already known from serological and phago-typization analyses that they belong for the most part to the same strain as that in the actual infectious process (Hobbs, Carrunthers and Gough 1947, Valentine and Hall-Smith 1952, Parker, Tomlinson and Williams 1955). In addition, a marked relationship was demonstrated between the titre of leucocidin and the degree of severity of the clinical condition. This parallel is not, of course, absolute, but it is clearly marked and the differences found are statistically highly significant. These results confirm the original findings of Panton and Valentine (1932) in considerably greater detail and on far more extensive material.

It is also necessary to consider whether the method used can provide an answer to the question of the pathogenic significance of staphylococcal leucocidin. Specific staphylococcal leucocidin is a substance which is selective for human leucocytes. Its action on the white blood cells of the rabbit, guinea-pig and rat is relatively about five times weaker as compared with its action on human blood cells. For this reason the significance of specific human leucocidin can only be evaluated by an analysis of material from infections in man and not by animal experiments, in which its action is not sufficiently manifest and is concealed by the toxic effect of  $\alpha$  toxin.

Staphylococcal  $\alpha$  toxin plays a decisive role in experimental infection in animals. It is also of unquestionable significance in acute hypertoxic staphylococcal sepsis (Burnet and Kellaway 1930, Kleiger and Blair 1940), but its role in banal forms of staphylococcal infection is not yet sufficiently clear. It was found that titres of  $\alpha$  toxin are substantially the same in strains isolated from patients and from healthy subjects. This concurs with individual data in the literature on the low production of  $\alpha$  toxin in strains from clinically severe infections (Mlčochová 1941, Blair 1939, Lack and Wailling 1954) and with the communications of other authors (Stevens and Cort 1926, Tager and Hales 1947), who were unable, in a large number of strains, to find a connection between the amount of toxin and coagulase produced and clinical pathogenicity. Contrary findings are not very convincing. Marks (1952) determined only the extent of the haemolytic zone around grown colonies, Jackson and Dowling (1955) assess the pathogenicity of a strain according to whether they cultured it from the upper or lower part of the respiratory tract in patients with poliomyelitis.

There are two possible ways of putting these results to practical use: 1. from the aspect of diagnosis, i. e. of the differentiation between coagulase positive strains of different pathogenicity, and 2. in preventive immunology. Increased production of leucocidin indicates to a fair degree of certainty the infectious origin and thereby probably the virulence of a given strain. Only 13% of the strains of infectious origin had a leucocidin titre lower than 1 : 16. The finding of leucocidin titres in strains isolated from healthy subjects can be explained, with reference to the two-peak curve (fig. 3) on the assumption that the majority of "carrier" strains produce very small amounts of leucocidin and that some of the subjects investigated are carriers of extremely virulent staphylococci with the same properties as the strains isolated directly from pathological processes. This assumption could be confirmed by epidemiological observations, e. g. phage-typing. The finding that an elevated leucocidin titre helps to identify carriers of dangerous virulent staphylococci among hospital personnel, for example, would be of exceptional practical importance.

The second, and still more important question, is that of the utilization of these findings in immunisation practice and in the preparation of immunological preparations (toxoid, antiserum). Strains, media and methods of the purification and evaluation of staphylococcal preparations are at present selected on the basis of  $\alpha$  toxin production. In our opinion, the results described above show that specific leucocidin merits the same degree of consideration.



### Summary

A method for the simple demonstration of leucocidin specific for human blood cells was elaborated, by means of differential staining of killed and living leucocytes. The titre of specific leucocidin was determined in 476 strains, and the titre of *a* toxin in 542 strains, all of different origin.

In the case of *a* toxin there is no difference in the titre in strains of different origin. In the case of specific leucocidin, strains isolated from a pathological process form far more leucocidin than strains isolated from healthy subjects. There is a statistically significant correlation between the titre of the leucocidin and the degree of severity of the condition evoked by the strains in question. The characteristics of the strains isolated from healthy subjects show that this is a non-homogenous group, which contains both banal carriers of only slightly pathogenic staphylococci and also carriers of strains with the same properties as those isolated from infections.

These results demonstrate the possibility of diagnosing particularly virulent and dangerous strains of staphylococci according to the production of leucocidin. When preparing a toxoid and staphylococcal serum for therapeutic purposes, the strains and also the methods should be selected not only according to the titration of *a* toxin but also according to the production of specific leucocidin.

### References

- Blair, J. E.: The Pathogenic Staphylococci. Bact. Rev. 3 : 97, 1939.
- Burnet, F. M.: The Exotoxins of Staphylococcus pyogenes aureus. J. Path. Bact. 32 : 717, 1929.
- Burnet, F. M., Kellaway, C. H.: Recent Work on Staphylococcal Toxins with Special Reference to the Interpretation of the Bundaberg Fatalities. Med. Austr. 17 : 295, 1930.
- Downie, A. W.: A Comparison of the Value of Heat-killed Vaccine and Toxoid as Immunising Agents against Experimental Staphylococcal Infection in the Rabbit. J. Path. Bact. 44 : 573, 1937.
- Hobbs, B. C., Carruthers, H. L., Gough, J.: Sycosis barbae: Serological Types of Staphylococcus pyogenes in Nose and Skin, and Results of Penicillin Treatment. Lancet II : 572, 1947.
- Christie, R., North, E. A., Parlin, B. J.: Criteria of Pathogenicity in Staphylococci. Austr. J. Exp. Biol. 24 : 73, 1946.
- Jackson, G. G., Dowling, H. F., Lepper, M. H.: Pathogenicity of Staphylococci. A Comparison of Alfa Hemolysin Production with the Coagulase Test and Clinical Observations of Virulence. New England J. Med. 252 : 1020, 1955.
- Jensen, T., Maaloe, O.: A Study of the Action of Staphylococcal Toxin on Leucocytes. Acta path. microb. Scand. 27 : 313, 1950.
- Johanovský, J.: Příprava stafylokokového toxinu a anatoxinu kultivací na celofánu. Čs. epid. mikr. 5 : 41, 1956.
- Kleiger, B., Blair, J. E.: Correlation between Clinical and Experimental Findings in Cases Showing Invasion of the Blood Stream by Staphylococci. Surg. Gyn. Obst. 71 : 770, 1940.
- Kredel, F. E., Sant, H. M.: Viability of Cells in Inflammatory Exudates. Arch. Pathol. 22 : 464, 1936.
- Lack, C. H., Wailling, D. G.: A Study of 435 Strains of Staphylococcus with Reference to Factors which may Contribute to Pathogenicity. J. Path. Bact. 68 : 431, 1954.
- Málek, I.: Nerovnocennost bakteriálních buněk při dělení. Čs. biologie 3 : 135, 1954.
- Marks, J.: Recognition of Pathogenic Staphylococci with Notes on Non-specific Staphylococcal Haemolysin. J. Path. Bact. 64 : 175, 1952.
- Mlčochová, M.: Výroba pyokokového toxinu. Čas. lék. čes. 80 : 298, 1941.
- Panton, P. N., Valentine, F. C. O.: Staphylococcal Toxin. Lancet II : 506, 1932.
- Parker, M. T., Tomlinson, A. J. H., Williams, R. E. O.: Impetigo Contagiosa. The Association of Certain Types of Staphylococcus aureus and Streptococcus pyogenes with Superficial Skin Infections. J. Hyg. 53 : 458, 1955.
- Proom, H.: The Interrelationship of Staphylococcal Leucocidins. J. Path. Bact. 44 : 425, 1937.

- Ramon, G., Richou, R., Jourichitch, M.: Sur le mecanisme de l'immunité conférée par l'anatoxine staphylococcique à l'égard de l'infection par les staphylocoques virulents. *Rev. d'Immunol.* 1: 482, 1936.
- Ramon, G.: Le principe des anatoxines et ses applications. Paris 1950.
- Ríman, J.: Ontogenický vývoj kostní dřeně u krys. *Rozpravy ČSAV* 1957 (in press).
- Selbie, F. R., Simon, R. D.: Virulence to Mice of *Staphylococcus pyogenes*, its Measurement and its Relation to Certain in vitro Properties. *Brit. J. Exp. Path.* 33: 315, 1952.
- Schwabacher, H., Cunliffe, A. C., Williams, R. E. O., Harper, G. J.: Identification of Pathogenic Staphylococci. *Brit. J. Exp. Path.* 26: 124, 1945.
- Stevens, F. A., Cort, L.: Toxicity of Filtrates of *Staphylococcus aureus* from Human Infections and from Normal Nasopharynx. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 24: 392, 1926.
- Šebek, V., Schubert, J., Johanovský, J.: Význam stafylokokové vaginální infekce pro vznik poporodní subfebrilie. *Čs. gynaekologie* 1957 (in press).
- Tager, M., Hales, H. B.: Quantitative Coagulase and Toxin Production by Staphylococci in Relation to the Clinical Source of the Organism. *Yale J. Biol. Med.* 20: 41, 1947.
- Turpin, A., Relyveld, E. H., Pillet, J., Raynaud, M.: Purification de la toxine et de l'anatoxine staphylococcique alpha. *Ann. Inst. Pasteur* 87: 185, 1954.
- Valentine, F. C. O.: On the Role of the Toxin in Staphylococcal Infections. *Lancet* II: 526, 1936.
- Valentine, F. C. O., Butler, E. C. B.: Specific Immunity in Acute Staphylococcal Osteomyelitis. *Lancet* II: 973, 1939.
- Valentine, F. C. O., Hall-Smith, S. P.: Superficial Staphylococcal Infections. *Lancet* I: 351, 1952.
- Wittler, R. G., Pillemmer, L.: The Immunochemistry of Toxins and Toxoids. V. The Solubility of Staphylococcal Toxin in Methanolwater Mixtures under Controlled Conditions of pH, Ionic Strength and Temperature. *J. Biol. Chem.* 23: 174, 1948.
- Пучков, Н. В., Титова, С. М.: Модификация метода для изучения фагоцитарной активности лейкоцитов. *Физиол. журнал* 38: 456, 1952.
- Выгодчиков, Г. В.: Микробиология и иммунология стафилококковых заболеваний. Москва 1950.

## Значение стафилококкового альфа токсина и лейкоцидина

Ю. ИОГАНОВСКИЙ

### Резюме

Был разработан удобный метод определения стафилококкового лейкоцидина, специфического для кровяных телец человека, — с помощью дифференциальной окраски живых и убитых лейкоцитов. Титр специфического лейкоцидина был определен у 476 коагулаза-положительных штаммов различного происхождения, титр альфа токсина — у 542 штаммов.

У альфа токсина нет разницы в титре у штаммов различного происхождения. У специфического лейкоцидина штаммы, выделенные в течение патологического процесса, образуют гораздо больше лейкоцидина, чем штаммы, изолированные от здоровых лиц. Существует статистически значимая корреляция между титром лейкоцидина и серьезностью заболевания, вызванного данным штаммом. Характеристика штаммов, выделенных от здоровых лиц, показывает, что речь идет о неоднородной группе, включающей как банальное носительство малопатогенных стафилококков, так и носительство штаммов тех же качеств, как и штаммы инфекционного происхождения.

Эти результаты открывают возможность диагностического определения особо вирулентных и опасных штаммов стафилококков по образованию лейкоцидина.

При приготовлении вакцины и лечебной противостафилококковой сыворотки необходимо подбирать штаммы и рабочие приемы не только на основании титрации альфа токсина, но и по образованию специфического лейкоцидина.

## FOLIA BIOLOGICA

Tom. III. [1957] — Fasc. 1.

---

### Metabolic Products During the Growth of *Clostridium acetobutylicum*

J. DYR and J. PROTIVA

Technical University, Department of Fermentation Chemistry and Technology, Praha

Received October 19, 1956

The process of acetone-butanol fermentation brought about by *Clostridium acetobutylicum* has long been subjected to detailed study by microbiologists, fermentation technologists and biochemists. In summing up the findings, however, it is seen that the whole process, although technologically controlled to a certain extent, has not been so thoroughly investigated from the microbiological and biochemical point of view as many other fermentation processes. This is due mainly to the experimental difficulties of fermentation on a laboratory scale and to its complexity, involving qualitative changes in the organism in the course of fermentation.

After a great deal of research work on the general laws of living Nature, Soviet investigators began to study the physiological development of microorganisms. In this connection they tried to resolve several questions of successive stages of acetonebutanol fermentation. This was chiefly done by Jerusalimsky (1946, 1951) who dealt with the physiology of butyric acid bacteria and of *Cl. acetobutylicum*, which produces neutral solvents.

So far nothing is known of the conditions causing the transition of a culture of *Cl. acetobutylicum* from the first stage to the second stage of fermentation, or of the causes of the changes in the physiological properties of the organism. In the world literature, with the exception of Soviet literature, no particular attention has been paid to this problem. The above mentioned communications of Jerusalimsky explained these changes on the basis of individual development during fermentation of the culture.

The subject of the present study is this transition from the first into the second stage. At the same time attention is centred on the conditions and state of the external environment and on the state of the culture producing fermentation.

#### Materials and Methods

In our experiments an industrial culture of *Cl. acetobutylicum*, strain Ca 3, isolated by Dyr in 1946, was used. Stock cultures were prepared on a mixture of one part soil and one part sand. Before sealing, the tubes were dried over calcium chloride; they were then sealed with paraffin wax and stored in a refrigerator at 4° C. Vegetative seed cultures were taken from the same stock for all experiments.

The experiments were carried out on a complex fluid medium, a modification of Speakman's mixture of salts:  $K_2HPO_4$  0.1%;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.02%;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.001%;  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  0.001%; NaCl 0.001 %. To a 750 ml. solution of these salts 200 ml. of tuber water from 120 g. potatoes, 40 g. glucose, 4 ml. yeast autolysate according to Weitzmann and 5 g. corn-steep (55% dry weight) were added. The volume was made up to one litre.

The tuber water was prepared from potatoes in the following way: The juice of finely grated potatoes was removed by pressing and the press cake washed with water and pressed repeatedly. The tuber water and the washings were mixed. The starch was removed by centrifuging, the heat-precipitable proteins by heating in a water-bath for 30 minutes and by centrifuging. The clear brown liquid was used for

preparing the medium, the pH of which was adjusted to 6.0 before sterilization. The medium was autoclaved under a pressure of one atmosphere for 30 minutes, then rapidly cooled by a stream of cold water to 35–38° C and immediately inoculated from a 20-hour-old vegetative culture. The volume of the inoculum amounted to 2% of the final volume of the medium.

A test-tube containing potato mash to which a small amount of soil and sand had been added was used in preparing the inoculum. The test-tube (16 × 180 mm.) was subjected to heat shock for 120 seconds, cooled and incubated at 37–38° C. Samples were taken during the fermentation by means of a glass rod extending into the medium and with an overpressure of sterile carbon dioxide.

Butanol and ethanol were estimated by the method of Johnson (1932), acetone by the iodometric method of Goodwin (1920). Butyric and acetic acid were determined in the alkaline residue following the distillation of neutral products in the same way as butanol and ethanol but omitting the oxidation process. A solution of 73.4 g.  $K_2SO_4$  in 1000 ml. 5N  $H_2SO_4$  was added to the samples in the distillation tube, instead of the oxidation agent. The distillation constants for butanol and ethanol were experimentally determined for purposes of calculation by the method of Johnson (1932). Glucose was estimated by the method of Shaffer-Hartmann (1921). The solids of the microorganisms were determined by centrifuging 25 ml. of the culture medium, washing with distilled water and drying at 105° C.

Titrate acidity was determined by titrating 10 ml. of the centrifuged medium with 0.1 N KOH, with phenolphthalein as indicator.

pH values were measured by means of a quinhydrone electrode on a Multiscop II electronic pHmeter. The redox potential was measured by means of a platinum electrode on a potentiometer, with a galvanometer as a zero indicator (L. Schildknecht, Zurich). A saturated calomel electrode served as the standard

electrode. The measurement was made at 30° C. When taken from the fermentation vessel the samples to be measured were already covered with a layer of compact foam which prevented contact of the liquid with the air.

### Results

The experimental part of the present work was commenced by observing the course of the fermentation curves for the culture of Ca3 grown on the medium described. It was essential to find out whether the course of cultivation and the end-products were similar to those with a natural medium. The results of one of the experiments are given in fig. 1. The 60-hour fermentation time does not exceed the usual time for laboratory-scale experiments with small volumes. The curve for titratable acidity, illustrating the accumulation of organic acids, mostly volatile, had a normal course with two inflections. The total yield of

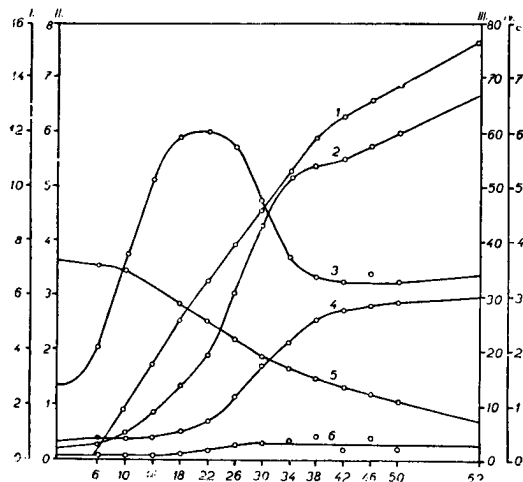


Fig 1. Fermentation Curves for *Cl. acetobutylicum*, strain Ca 3. Curves: 1 - gas, 2 - butanol, 3 - acidity, 4 - acetone, 5 - glucose, 6 - ethanol. Ordinate: hours of fermentation, abscissa: I - fermentation gases l/l medium, II - acidity, III - glucose mg/ml., IV - neutral solvents mg/ml.

solvents in actual production is approximately 32%, calculated by the sugar fermented. In our case, after correcting for the products introduced with the inoculum, the yield amounted to 30%, calculated by glucose fermented.

The positive results of this experiment enabled investigations to be carried out on the differences in the metabolism of *Cl. acetobutylicum* in the first and second stages of fermentation. These differences can be estimated only approximately, from the course of the acidity curves and of those of neutral products.

From the differences in the results of analysis of the culture media before and after incubation, information on the biological activity of the culture was obtained in

Tab. 1. Effect of the Age of Culture on Metabolic Product Formation

Mg./ml.	Age of culture 10 hr.			Age of culture 24 hr.		
	before incubation	after incubation	difference	before incubation	after incubation	difference
Glucose	30.40	22.65	- 7.75	20.90	13.87	- 7.03
Acetic acid	2.44	2.19	- 0.25	2.14	2.58	+ 0.44
Butyric acid	0.62	2.35	+ 1.73	0.62	0.01	- 0.61
Butanol	0.18	0.80	+ 0.62	2.66	4.14	+ 1.48
Acetone	0.19	0.27	+ 0.08	0.90	1.35	+ 0.45
Ethanol	0.55	0.79	+ 0.24	0.92	1.74	+ 0.82
Acidity	2.80	—	—	3.25	—	—
Bact. solids	—	4.65	—	—	5.65	—

a very short time; in this way the factor of a continuous change of metabolism in the transition from the first stage to the second stage was eliminated. A comparison of the data for biochemical activity in the first and second stages is given in tab. 1. From this table it follows that the cells of *C. acetobutylicum* differ at various stages of fermentation in their metabolic products, especially in the proportion of butyric and acetic acid.

The authors were greatly interested in the environmental conditions of the culture during its development, which assimilates and changes the medium by means of its metabolism. It was decided to influence or alter the individual variables of the medium and thus ascertain the conditions which cause (or contribute to) transition of the culture into the second, productive, stage of fermentation.

A series of similar experiments was undertaken in which a study was made of the values of the redox potential and pH, the formation of acids and the development of bacterial substance in the first and second stage. The inflection in the curve of titratable acidity was taken as indicating the transition to the second stage of fermentation. Flasks, each containing 1,500 ml. of fluid medium, were inoculated with 30 ml. of a 20-hour vegetative inoculum. The titratable acidity, pH, Eh and the bacterial dry matter were estimated during fermentation. The course and correlation of the curves shown in fig. 2 are in full accord with the other parallel experiments. In every case a change in titratable activity occurred between the 12th and 16th

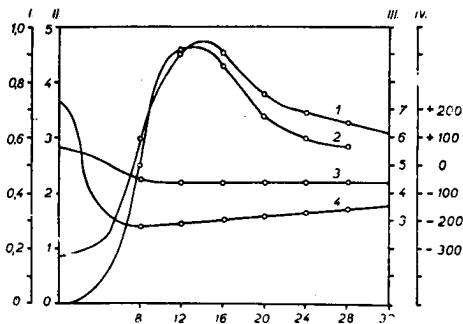


Fig. 2. Correlations between the environmental conditions and the growth of *Cl. acetobutylicum*. Curves: 1 - acidity, 2 - bacterial solids, 3 - pH, 4 - Eh (30°). Ordinate: hours of fermentation, abscissa: I - bacterial solids mg/ml., II - acidity, III - pH, IV - Eh (30°).

hour of fermentation. This is also in agreement with the pH curve, which, after an initial fall, is maintained at the same value during the second stage. The Eh curve falls rapidly during the first hours to negative values and reaches the minimum before the acidity curve reaches its peak. In the subsequent course of fermentation it rises only slowly. The course of the curve for bacterial dry matter is very interesting. In every case it had a relatively sharp peak and always reached a maximum

before the sharp change in the acidity curve. This means that the bacteria proliferate, and the bacterial matter increases, only in the first stage of fermentation. No great changes, capable of altering the physiological activity of the culture, occurred in the other variables measured, apart from the curve for the solids and titratable acidity.

It was necessary to ascertain whether the transition of the cultures into the second stage depends on the accumulation of a certain quantity of free acids or whether the formation of neutral solvents begins, for reasons of energy, only when the culture

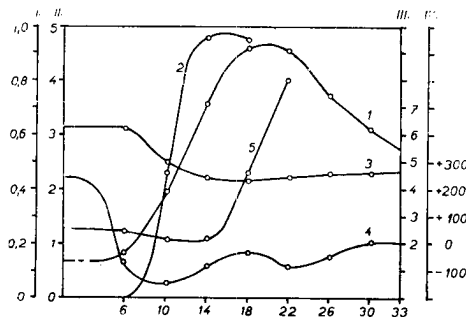


Fig. 3a. Control.

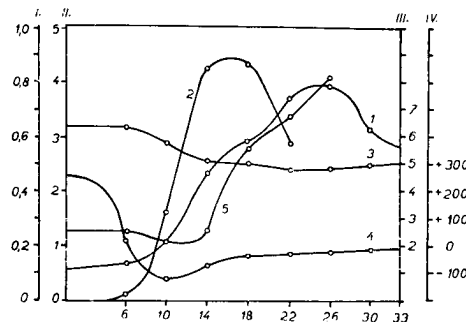


Fig. 3b. Formed acids neutralized by calcium carbonate.

Fig. 3a and 3b. Effects of Bacterial Solids and Titratable Acidity on the Transition of *Cl. acetobutylicum* into the "reducing" Stage. Curves: 1 - acidity, 2 - bacterial solids, 3 - pH, 4 - Eh (30°), 5 - acetone. Ordinate: hours of fermentation, abscissa: I - acetone and bacterial solids, mg/ml., II - acidity, III - pH, IV - Eh (30°).

ceases to synthesize living matter and to proliferate. In order to do this the course of the curves for titratable acidity and bacterial solids were dealt with separately in the next experiments by neutralizing part of the organic acids formed in the early hours of fermentation. In the first experiment sodium carbonate was used, which was added three times during the first ten hours of fermentation. In further experiments a slight excess of calcium carbonate was added, which takes up the fatty acids being formed until approximately the tenth hour of fermentation. The results of both experiments were identical.

The results of the experiment with the neutralization of the acids being formed by means of an excess of calcium carbonate are given in fig. 3a and 3b together with the controls. In this experiment the formation of acetone was observed as the typical metabolic product of the second stage, as shown above. In this experiment a correlation was demonstrated between the value of titratable acidity, the growth of the organism and acetone formation. In the control experiment, the formation of acetone started when the amount of solids had reached a maximum, i. e. at the time when volatile acids were still increasing in the medium. From this alone, it could be deduced that the inflection in the acidity curve did not synchronize with the transition phase. This deduction is supported by the correlation of these values during fermentation, in the initial presence of calcium carbonate. In this case, the break of titratable acidity occurred in about the 26th hour, whereas the curve for solids reached its height between the 14th and 18th hour. Acetone formation, typical for the second stage of fermentation, starts from the 14th hour and is obviously dependent on the transition of the culture into the stationary stage.

### *Discussion*

In the present work the correlation between the growing bacterial matter of *Cl. acetobutylicum*, the change in the reaction of the medium and the production of oxidized and reduced forms of metabolites was investigated. Attempts were made to determine the conditions required for the transition of cultures from the first "acid" stage to the second productive stage, chiefly for large scale production. From the biological activity of the culture in the first and second stage a picture was obtained of the changes in the microorganic enzyme system during fermentation. If acetic acid is taken as a butyric acid precursor (which has been demonstrated in a number of papers, Wood, Brown and Werkmann 1945, Davies 1942), it is obvious that the accumulating acetic acid is the principle metabolic product of the early hours of fermentation. As late as the tenth hour the ratio of acetic acid to butyric acid is in favour of acetic acid; at this time, however, acetic acid is rapidly converted into butyric acid, as seen by the decrease in the total amount of acetic acid and the considerable increase in butyric acid after the two-hour incubation of a concentrated culture. The other path of acetic acid conversion, i. e. to acetone, is very slow at this stage. Butanol and ethanol production, however, takes place to a certain extent before the break in the acidity curve. In the second stage of fermentation, neutral products, especially butanol, are formed in larger amounts. Consequently butyric acid formation is more rapid than that of acetic acid. On the other hand acetic acid accumulates offering a source for acetone or ethanol formation. It is evident that acetone is the only characteristic product of the second stage. Ethanol and butanol were produced even in the first "acid" stage of fermentation but only in small amounts. The increasing production of acetone is the indication of the transition of the culture from one stage to the other. Our experiments with the neutralization of acids accumulating in the first stage show that the amount of free acids and consequently, to a certain extent, even the change in pH values are not decisive for the transition of the culture to the second stage. Changes in pH, if sufficiently great, may exert a considerable influence on the rate of the individual partial reactions. The changes actually measured in pH values cannot, however, account for the appearance of the ability to form acetone in the second stage of fermentation. The same applies to the redox potential; changes in this seem to be associated with the rapid proliferation of the microorganisms, as suggested by Hewitt (1950). The redox potential is, for strict anaerobes, rather a limiting factor in the early hours of growth in a fresh culture medium. The cause of the change in metabolism is, therefore, not the shift in the balance of enzymatic reactions converting the central metabolic products of *Cl. acetobutylicum* (according to recent findings, acetic acid and its active form) into butyric acid or acetoacetic acid. For this reason attention was directed to the proliferation of the culture, where the course and, in particular, the termination of the logarithmic phase, was synchronous with the time of transition and the commencement of acetone production.

In earlier work of Peterson and Fred (1932) and more recent work of Jerusalimsky (1946) the curve of the number of microorganisms in the course of fermentation, was plotted. Hitherto, however, the growth of micro-organisms has not been considered in causal relationship to the stage of acetone-butanol fermentation.

### *Summary*

Studies in the physiological activity of *Cl. acetobutylicum* in the first and second stage of acetone-butanol fermentation showed acetone to be the product characterising the transition of the culture into the production stage.

The transition into the second production stage follows the completion of proliferation and the growth of cells in the culture, independent on the accumulation of free acids in the medium.

The change in the curve for titratable acidity, generally associated with the transition into the second stage, is, according to the experimental results presented, due to a change in the physiological activity of the culture after the completion of its growth and proliferation.

#### References

- D a v i e s, R.: Studies on the Aceton-butyl alcohol Fermentation. 2. Intermediates in the Fermentation of Glucose by *Cl. acetobutylicum*. 3. Potassium as an Essential Factor in the Fermentation of Maize Meal by *Cl. acetobutylicum*. *J. Biochem.* 36 : 582, 1942.
- D y r, J.: Výroba organických rozpustidel kvasnou cestou. Sborník přednášek, V. část, 59, 1954, Banská Štiavnica.
- G o o d w i n, L.: Modification of the Messinger Method for Aceton Determination. *J. Am. Chem. Soc.* 42 : 39, 1920.
- H e w i t t, L. F.: Oxidation-reduction Potentials in Bacteriology and Biochemistry. Edinburgh 1950.
- J o h n s o n, M. J.: Determination of Small Amounts of Ethyl- and Butylalcohol. *Ind. Eng. Chem.* 4 : 20, 1932.
- P e t e r s o n, W., F r e d, E. B.: The Butanol-Aceton Fermentation of Cornmash. *Ind. Eng. Chem.* 24 : 237, 1932.
- S h a f f e r, P. A., H a r t m a n n, A. F.: The Iodometric Determination of Copper and Its Use in Sugar Analysis. II. *J. Biol. Chem.* 45 : 365, 1921.
- W o o d, H. G., B r o w n, R. W., W e r k m a n n, C. H.: Mechanism of the Butylalcohol Fermentation with Heavy Carbon Acetic and Butyric Acids and Acetone. *Arch. Biochem.* 6 : 243, 1945.
- И е р у с а л и м с к и й, Н. Д.: О физиологических стадиях в развитии бактерий. *Микробиология* 15 : 406, 1946.
- И е р у с а л и м с к и й, Н. Д.: Онтогенетическое развития культуры маслянокислых бактерий. *Микробиология* 20 : 204, 1951.

## Продукты обмена веществ в течение роста *Clostridium acetobutylicum*

И. ДЫР и Ю. ПРОТИВА

### Резюме

В настоящей работе мы исследовали соотношения между ростом и размножением микроба *Clostridium acetobutylicum*, изменениями условий среды и образованием окисленных и восстановленных форм метаболитов. Мы стремились определить условия, необходимые для перехода культуры *Cl. acetobutylicum* от первой, «кислой», ко второй, «восстановительной», фазе ацетобутанолового брожения.

Изучив с помощью концентрированной взвеси микроба биохимическую деятельность культуры в различных фазах брожения, мы получили картину изменений системы его ферментов. Из результатов опытов очевидно, что в течение первых часов брожения результатом обмена веществ является прежде всего накопление уксусной кислоты. Позднее, но еще до перехода культуры к «восстановительной» фазе, уксусная кислота быстро превращается в масляную, что при наших опытах проявлялось значительной убылью уксусной кислоты и увеличением количества масляной кислоты в течение 2-часовой инкубации



концентрированной взвеси 10-часовой культуры микроба. Вторым способом превращения уксусной кислоты — ее превращение в ацетон — осуществлялся только во второй фазе одновременно с образованием значительных количеств бутанола и этанола. Из результата опытов вытекает, что единственным продуктом, характеризующим обмен веществ у *Cl. acetobutylicum* во второй фазе брожения, является ацетон.

При нейтрализации кислот, скопляющихся в течение первой фазы брожения, мы получили такие взаимоотношения отдельных исследуемых величин, которые доказывают, что причиной изменения метаболизма при переходе культуры во вторую фазу брожения не является простое изменение скоростей протекания отдельных реакций превращения центрального продукта обмена веществ *Cl. acetobutylicum* (по новейшим взглядам, уксусная кислота или ее активная форма) в масляную или ацетоуксусную кислоту.

Поэтому мы сосредоточили свое внимание на рост и размножение культуры; течение и в особенности окончание логарифмической фазы отвечало (при наших опытах) времени перехода от одной фазы к другой и начала образования ацетона. Мы полагаем, что причиной накопления энергетически бедных веществ (окисленные формы) в течение первой фазы брожения является повышенное потребление энергии для синтеза клеточного вещества, количество которого в течение «кислой» фазы брожения возрастает логарифмически. Только после окончания размножения и роста культуры наступают изменения в обмене веществ и вторая фаза брожения, характеризующаяся образованием восстановленных метаболитов, этилового спирта и бутанола.

Поэтому главным условием успешности ацетон-бутанолового брожения мы считаем обеспечение оптимальных условий для быстрого развития культуры, в особенности же отбор активных, быстро размножающихся продуктивных штаммов *Cl. acetobutylicum*.

## FOLIA BIOLOGICA

Tom. III. (1957) — Fasc. 1.

### The Influence of Ions on the Formation of Protease by the Actinomyces *Streptomyces griseus*

J. CHALOUPKA

Institute of Biology, Czechoslovak Academy of Science, Department of Microbiology, Praha

Received October 20, 1956

Ions are important regulators of metabolic processes. They may activate or inhibit enzymes and influence permeability, etc. Biologically, the most important cations are  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  and  $Fe^{2+}$ . Potassium and magnesium ions are essential in the formation of protein and growth processes (Cannon et al. 1952, Frost and Sandy 1953, Foster and Heiligman 1949, Friedman and Fox 1954, Webb 1948, 1949, 1953). Investigations were made to ascertain whether it is possible to influence growth of a culture and the formation of protease by means of the various ions which are a normal component of the nutrient medium.

#### Material and Methods

The culture, method of cultivation and of measuring proteolytic activity in the culture fluid and the dry matter have already been described in a previous communication (Chaloupka 1956a, b).

Culture media: Waksman medium B (WB, containing ions  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  and  $Zn^{2+}$ ). Standard Z media, composition: peptone 2%, glucose 2%, acid ammonium phosphate (separately sterilised) 0.1%. Medium Z 1/2, containing 1.0% peptone, 1.5% glucose and 0.1% ammonium phosphate. The nutrient media were sterilised twice at  $110^\circ C$  and the pH at the commencement of culturing was 7.1–7.3.

The ions under investigation were always used in the form of chlorides (with the exception of  $Fe^{2+}$ , where  $FeSO_4$  was used) and were always sterilised separately. The reagents were always analytically pure.

**Methods.** In long-term experiments, 48-hour-old cultures of actinomyces grown on a Z standard medium were inoculated into a Z 1/2 medium containing the appropriate amount of ions, in amounts of 1.0 ml./100 ml. nutrient medium in 500 ml. flasks. The flasks were then incubated on a shaker and the dry substance and protease activity in the culture fluid and in the cells were determined at given intervals.

In short-term experiments, a 48-hour-old culture grown on a Z medium was centrifuged, washed with water and suspended under aseptic conditions in water or in a nutrient solution containing the requisite ions. In order to ensure sterility, 300 units of penicillin G and 100 units of streptomycin per ml. were added; enzyme production was not affected by the presence of the antibiotics. The flasks containing the suspension of actinomyces mycelium were incubated for 24 hours on a shaker. Before incubation enzymatic activity was determined in the mycelium, after incubation in the supernatant fluid and in the mycelium.

**Determination of the activity of protease in the mycelium:** 10 ml. mycelium suspension were centrifuged, washed with distilled water and suspended in 0.5 ml. of  $5 \cdot 10^{-3} M$  solution of  $CaCl_2$  to stabilise the enzyme. On the surface of the suspension 0.5 ml. toluene was added. The test-tubes were then stoppered and placed in a thermostat at  $28-30^\circ C$ . Autolysis took from 1–3 days, according to the age of the mycelium. Autolysis was always carried out in a number of parallel specimens, which were stopped at given intervals. The toluene was carefully drawn off and the autolysate made up to the original volume, or half the original volume with distilled water. Proteolytic activity was then measured in these specimens by the usual method. The criterion for completion of autolysis was the reaching of constant protease activity in the autolysate. When determining the increase in activity following 24 hours' incubation, the values of activity in the supernatant fluid and in the mycelium were added, calculated to 1 mg. dry

substance or 1 ml. suspension and the value of activity in the mycelium prior to incubation subtracted. The values of proteolytic activity are the averages of 4–8 determinations; the values of dry weight are the averages of two specimens.

### Results

We first investigated the extent to which the ions being studied with reference to their influence on the formation of protease, might influence the activity or stability of protease and thus distort the results.  $K^+$  and  $Na^+$  had no effect on enzymatic activity or stability, even in a concentration of  $1 \cdot 10^{-1}$  M.  $Mg^{2+}$  had no effect on stability; in a concentration of  $1 \cdot 10^{-2}$  M it reduced activity by about 17%, but a concentration of  $1 \cdot 10^{-3}$  M had no effect.  $Ca^{2+}$  significantly stabilised the enzyme; in a concentration of  $10^{-2}$  M it reduced its activity by about 30%, but a concentration of  $1 \cdot 10^{-3}$  M had no effect. The ions  $Fe^{2+}$  and  $Zn^{2+}$  reduced activity and stability of the enzyme, even in a concentration of  $1 \cdot 10^{-3}$  M.

When studying the influence of ions on the production of protease, a combination of long-term experiments (five days) and short-term experiments (24 hours) was selected. The results of the long-term experiments (figs. 1, 2 and 3) are expressed in maximal activity (always reached on the fifth day) in relation to 1 mg. maximal dry substance (two-day-old culture). The values of activity are the sum of activity in the supernatant fluid and activity in the cells.

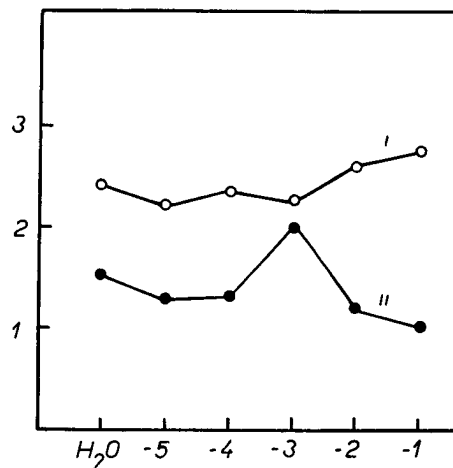


Fig. 1. Influence of  $Na^+$  on growth and formation of protease.

x: log. of concentration of ion. y: dry substance in mg./1 ml. (I); activity in a ·  $10^{-3}$  mEq. tyrosine to 1 ml of the medium (II).

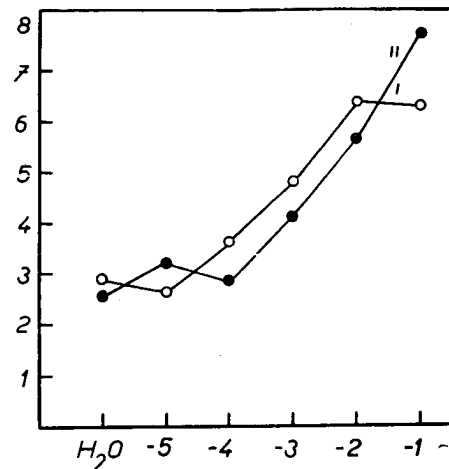


Fig. 2. Influence of  $K^+$  on growth and formation of protease.

These results can only be in the nature of a guide, as considerable inactivation of protease occurred in the course of the experiment. Of the ions under investigation, the most significant in their influence were the potassium ions, which increased both growth of the culture (dry substance) and also the formation of protease in concentrations when the maximal amount of dry substance had already been reached and increased no further. The ions  $Zn^{2+}$  and  $Fe^{2+}$  did not affect formation of the enzyme in concentrations lower than  $1 \cdot 10^{-3}$  M. In higher concentrations they inactivated the enzyme.

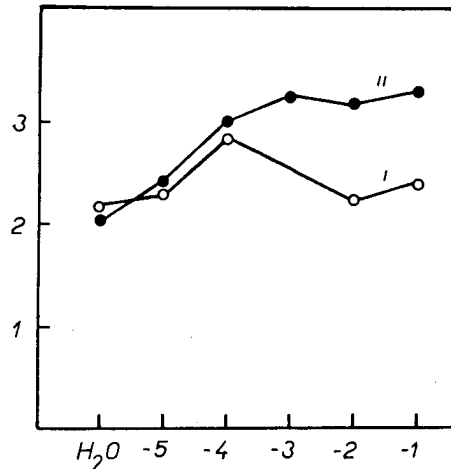


Fig. 3. Influence of  $Mg^{2+}$  on growth and formation of protease.  $x$ : log. of concentration of ion.  $y$ : dry substance in mg./ml. (I); activity in a .  $10^{-3}$  mEq. tyrosine to 1 ml of the medium (II).

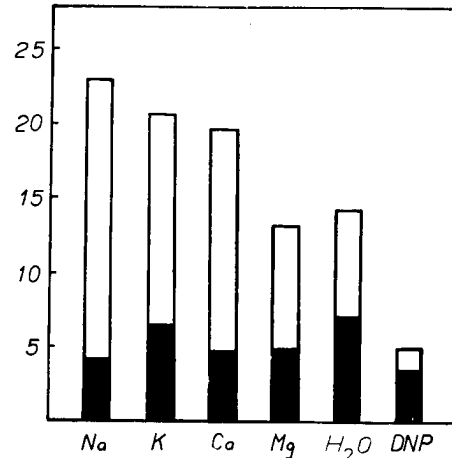


Fig. 4. Influence of ions on formation of protease in distilled water. Black columns: activity in cells; white columns: activity in supernatant fluid.  $y$ : activity in a .  $10^{-3}$  mEq. tyrosine to 1 mg. dry substance.

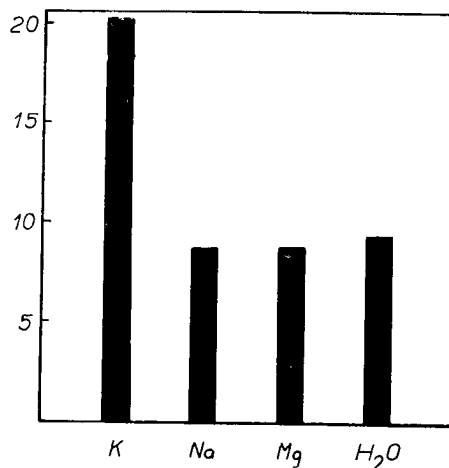


Fig. 5. Influence of ions on formation of protease in presence of nutrients.  $y$ : activity expressed in a .  $10^{-3}$  mEq. tyrosine to 1 mg. dry substance is the sum of activity in the cells and in the supernatant fluid.

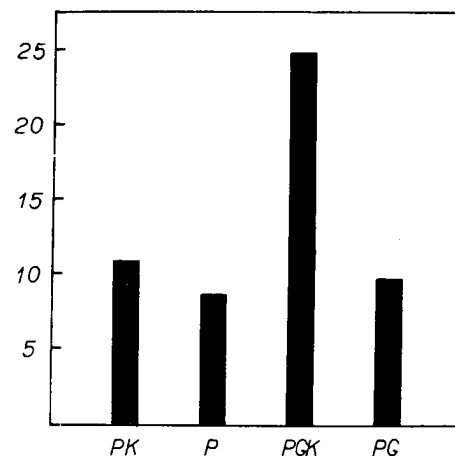


Fig. 6. Influence of  $K^{+}$  on short-term formation of protease in the presence of peptone and peptone + glucose. P: peptone; G: glucose; K:  $K^{+}$  ions.  $y$ : activity expressed in a .  $10^{-3}$  mEq. tyrosine to 1 mg. dry substance is the sum of activity in the cells and in the supernatant fluid.

These long-term experiments were supplemented by short-term experiments, in which the production of protease was studied during incubation in distilled water (fig. 4) and in the presence of nutrients (fig. 5). In these experiments the concentration of the ions was  $5 \cdot 10^{-2}M$ . The results are expressed as the increase in activity per 1 mg. dry substance. In incubation in distilled water (fig. 4), the decrease in dry substance was the same in every case, but the production of protease was stimulated

by  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  by approximately 100% as compared with the controls. The effect of the calcium ions can be explained by their stabilising action; magnesium ions had no effect. In the presence of nutrients, the production of protease was stimulated only by potassium ions, which increased the enzyme content by more than 100 % as compared with the controls. In these short-term experiments magnesium ions did not increase enzyme production.

It is evident from all the above experiments that potassium ions have the most profound effect on growth and on the formation of protease by the actinomyces, as they increased both growth and production of the enzyme. It is a well-known fact that  $\text{K}^+$  interferes very significantly in the metabolism of sugars by stimulating some of the processes associated with aerobic glycolysis (Ashford and Dixon 1935, Farmer and Jones 1942, Buchanan et al. 1949, Hastings et al. 1952, Rothstein and Demis 1953). An investigation was therefore made in our experiments (fig. 6) to determine whether potassium ions interfere in and specifically and directly influence proteosynthesis, or whether they act indirectly via glucose metabolism. The mycelium of *Streptomyces griseus* was therefore incubated, partly in a mixture of glucose and peptone and partly in a peptone solution only, always in parallel specimens with or without KCl in a concentration of  $5 \cdot 10^{-2} \text{M}$ . The potassium ions significantly stimulated the formation of protease only in the presence of glucose.

#### Discussion

The formation of protease by Gram-positive and Gram-negative micro-organisms is stimulated by ions, in particular by  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  and in the case of *Bacillus subtilis* by  $\text{Mn}^{2+}$  (Merill and Clark 1928, Haines 1931, Stockton and Wyss 1946). The action of calcium (Gorini 1951) consists chiefly in stabilising the enzyme rather than in increasing its production. In our own experiments,  $\text{Mg}^{2+}$  ions alone had a weak stimulating effect or no effect on the formation of protease by the actinomyces *Streptomyces griseus*. Potassium ions, on the other hand, had a very marked influence on growth of the culture and on the formation of protease. Their stimulating effects on the amount of dry substance was manifested in a substantially lower concentration than their action on formation of the enzyme. The literature contains many data on the action of potassium ions on metabolism, many of which have no bearing on one another or are at variance with one another.  $\text{K}^+$  is also an essential biogenic element for *Streptomyces griseus* (Acker and Lechevalier 1954). Its action interferes in practically all metabolic processes. It influences the assimilation of amino acids and proteosynthesis (Cannon et al. 1952, Frost and Sandy 1953, Davies et al. 1953, Folbergová 1955), fixation of free nitrogen (Fedorov 1950) and the formation of purines (Friedman and Fox 1954). A lack of potassium causes morphological changes in the nuclear apparatus (Fink 1950). The primary action of potassium, however, probably consists in its influence on sugar metabolism (Farmer and Jones 1942, Barinova 1948, Hofmann and Schenck 1950, Sen and Sankhala 1953).  $\text{K}^+$  penetrates the cells of micro-organisms only in the presence of hexose, in contrast to  $\text{Na}^+$  (Leibowitz and Kupermintz 1942, Cowie et al. 1949) and is probably bound in the cells as a hexosophosphate salt (Roberts et al. 1949). It is an activator of phosphorylation enzymes (Boyer et al. 1942, Bergmann et al. 1954), mediates the formation of metaphosphate in yeasts (Schmidt et al. 1949) and is essential in the synthesis of glutathione from  $\gamma$ -glutamylcysteine and glycine combined with a shift of  $\infty\text{P}$  from ATP (Snoke et al. 1953).

Our experiments investigating the influence of  $\text{K}^+$  in the presence of glucose and peptone on the formation of protease provide evidence in support of the conception that the action of potassium on proteosynthesis is associated with its influence on

sugar metabolism. Potassium ions increased production of the enzyme almost always only in the presence of glucose (fig. 6). On the basis of experiments investigating the influence of ions on the formation of protease without the presence of external nutrients (fig. 4), it is possible, however, to take the view that this mechanism is not of necessity the only one. Since in this case production of the enzyme was also stimulated by  $\text{Na}^+$ , whereas  $\text{Mg}^{2+}$  and probably  $\text{Ca}^{2+}$  did not affect it, it appears possible that in this case the action of the ions primarily took the form of influencing the permeability of the cells. This is borne out by the fact that in these experiments increased secretion of the enzyme into the medium occurred chiefly as a result of the influence of  $\text{Na}^+$ . It is possible that more intense diffusion of the enzyme from the cells caused a fall in its level in the cells and thus indirectly made further synthesis possible.

### Summary

A study was made of the influence of various ions on growth and on the formation of protease by the actinomyces *Streptomyces griseus*.

Growth of the culture, determined by the amount of dry substance, and production of the enzyme are significantly stimulated by  $\text{K}^+$  ions. The concentration of  $\text{K}^+$  required for producing an increase in dry substance is lower than the concentration required for affecting the production of protease.

The action of potassium ions probably consists in the way in which they influence sugar metabolism, as their action is dependent on the presence of glucose, in addition to a source of amino acids. Under the conditions of short-term production of the enzyme without the presence of external nutrients,  $\text{Na}^+$  increases the formation of protease as well as  $\text{K}^+$ . In this case it is possible that the action of both ions is related to the way in which they influence permeability.

### References

- Acker, R. F., Lechevalier, H.: Some Nutritional Requirement of *Streptomyces griseus* for Growth and Candidin Production. *Appl. Microbiol.* 2 : 157, 1954.
- Ashford, C. A., Dixon, K. C.: The Effect of Potassium on the Glucolysis of Brain Tissue with Reference to the Pasteur Effect. *Biochem. J.* 29 : 157, 1935.
- Bergmann, E. D., Littauer, U. Z., Volcani, B. C.: Formation of d-3-phosphoglyceric Acid from Pentoses by *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 56 : 174, 1954.
- Boyer, P. D., Lardy, H. H., Phillips, P. H.: The Role of Potassium in Muscle Phosphorylations. *J. Biol. Chem.* 146 : 673, 1942.
- Buchanan, J. M., Hastings, A. B., Nesbitt, F. B.: The Effect of the Ionic Environment on the Synthesis of Glycogen from Glucose in Rat Liver Slices. *J. Biol. Chem.* 180 : 435, 1949.
- Cannon, P. R., Frazier, L. E., Hughes, R. H.: Influence of Potassium on Tissue Protein Synthesis. *Metabolism* 1 : 49, 1952. (C. A. 46 : 8216 g.)
- Cowie, D. B., Roberts, R. B., Roberts, J. Z.: Potassium Metabolism in *Escherichia coli*. I. Permeability to Sodium and Potassium Ions. *J. Cellular Comp. Physiol.* 34 : 243, 1949.
- Davies, R., Folkes, J. P., Gale, E. F., Bigger, B. C.: Assimilation of Amino Acids by Microorganisms. XVI. Changes in Sodium and Potassium Accompanying the Accumulation of Glutamine Acid and Lysine by Bacteria and Yeast. *Biochem. J.* 54 : 430, 1953.
- Farmer, S. N., Jones, D. A.: Influence of Potassium on Sugar Metabolism. *Nature* 150 : 768, 1942.
- Folbergová, J.: Vliv iontů na tvorbu lipázy v tkáňových řezech pankreatu. Diplomová práce, Praha 1955.
- Finck, H.: Experimental Investigations of the Effect of a Nutrient Salt Deficiency on Mitosis in the Root Tips of *Vicia faba*. *Chromosoma* 3 : 510, 1950.
- Foster, J. W., Heiligman, F.: Mineral Deficiency in Complex Organic Media as Limiting Factor in the Sporulation of Aerobic Bacilli. *J. Bact.* 57, 613, 1949.
- Friedman, S., Fox, C. H., Jr.: The Relation of Potassium to Metabolism and Purine Synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 68 : 186, 1954.

- Frost, D. V., Sandy, H. R.: Effect of Mineral Deficiencies on Amino Acid Utilization. Critical Role of Potassium and Phosphorus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 83 : 102, 1953.
- Gorini, L., Crevier, M.: Le comportement de la protéinase endocellulaire de *Micrococcus lysodeikticus* au cours de la lyse de cet organisme par lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta* 7 : 291, 1951.
- Haines, R. B.: The Formation of Bacterial Proteases, Especially in Synthetic Media. *Biochem. J.* 25 : 1851, 1931.
- Hastings, A. B., Feng, Ch. T., Nesbett, F. B., Sinex, R. M.: Carbohydrate Metabolism in Rat Liver Slices. I. The Effect of Cations in the Media. *J. Biol. Chem.* 194 : 69, 1952.
- Hoffmann, E., Schenk, H.: Über den Einfluss des Kalium-Ions auf Bildung und Aktivität der Fermente bei Hefen und Schimmelpilzen. *Biochem. Ztschr.* 321 : 98, 1950.
- Chaloupka, J.: Proteolytické enzymy aktinomycety *Streptomyces griseus* II. Vliv povahy a koncentrace dusíku na sekreci proteasy. *Čs. mikrobiologie* 1 : 32, 1956a.
- Chaloupka, J.: III. Krátkodobá produkce enzymu. *Čs. mikrobiologie* 1 : 241, 1956b.
- Leibowitz, J., Kupermintz, N.: Potassium in Bacterial Fermentation. *Nature* 150 : 233, 1942.
- Merrill, A. T., Clark, M. W.: Some Conditions Affecting the Production of Gelatinase by *Proteus* Bact. *J. Bacteriol.* 15 : 267, 1928.
- Roberts, R. B., Roberts, I. Z., Cowie, D. B.: Potassium Metabolism in *Escherichia coli*. II. Metabolism in the Presence of Carbohydrates and their Metabolic Derivates. *J. Cellular Comp. Physiol.* 34 : 259, 1949.
- Rothstein, A., Demis, C.: The Relation of the Cell Surface to Metabolism. The Stimulation of Fermentation by Extracellular Potassium. *Arch. Biochem. Biophys.* 44 : 18, 1953.
- Sen, H. D., Sankhala, R. H.: Citric Acid Production of *Aspergillus fumigatus*. *Intern. Sugar. J.* 55 : 273, 1953.
- Schmidt, G., Hecht, L., Thannhauer, S. J.: Effect of Potassium Ions on the Absorption of Orthophosphate and the Formation of Metaphosphate by Baker's Yeast. *J. Biol. Chem.* 178 : 733, 1949.
- Snoke, J. E., Yanari, S., Block, K.: Synthesis of Glutathione from  $\gamma$ -glutamyl-cystein. *J. Biol. Chem.* 201 : 573, 1953.
- Stockton, J. R., Wyss, A.: Proteinase Production by *Bacillus subtilis*. *J. Bact.* 52 : 227, 1946.
- Waksman, S. A.: The Actinomycetes. Waltham 1950.
- Webb, M.: Influence of Magnesium on Cell Division I. Growth of *Clostridium welchii* in Complex Media Deficient in Magnesium. *J. Gen. Microbiol.* 2 : 275, 1948.
- Webb, M.: II. The Effect of Magnesium on Growth and Cell Division of Various Bacterial Species in Complex Media. *J. Gen. Microbiol.* 3 : 410, 1949.
- Webb, M.: Effect of Magnesium on Cellular Division in Bacteria. *Science* 118 : 607, 1953.
- Барина, С. А.: Влияние калия и магния на развитие *Rhizopus nigricans* и на его способность к кислотообразованию. *Микробиология* 17 : 10, 1948.
- Федоров, М. В.: Влияние отдельных питательных элементов на фиксацию азота атмосферой азотобактером. *ДАН СССР* 72 : 157, 1950.

Влияние ионов на образование протеазы лучистым грибом  
*Streptomyces griseus*

Ю. ХАЛОУНКА

*Резюме*

С помощью длительных и краткосрочных опытов мы исследовали влияние различных ионов на рост и образование протеазы у актиномицета *Streptomyces griseus*. Мы отмечали увеличение активности протеазы как в культивационной жидкости, так и в мицеллии лучистого грибка, разрушая его путем стерильного автолиза в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , действующих как стабилизатор энзима. При краткосрочных опытах мы центрифугировали и отмывали 48-часовой мицеллий и инкубировали его в воде или в питательном растворе на качалке в присутствии пенициллина и стрептомицина, которые не влияли на образование энзима, но предупреждали возможность заражения.

Мы изучали влияние  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$ . Наиболее значительное влияние оказывали ионы калия, которые заметно стимулировали как рост, так и продукцию протеазы, — и в присутствии питательных веществ, и без них (при краткосрочном опыте). На рост влияла уже гораздо более низкая концентрация ионов, чем на образование энзимов. Стимулирующее действие  $\text{K}^+$  на образование протеазы связано, вероятно, с его влиянием на метаболизм углеводов, так как оно проявляется только в присутствии глюкозы (наряду с источником аминокислот). В условиях краткосрочного стимулирования продукции энзима, без прибавления питательных веществ, образование протеазы повышается, кроме  $\text{K}^+$ , и под влиянием  $\text{Na}^+$ . Действие обоих ионов обусловлено в этом случае, вероятно, их влиянием на проницаемость. Ионы  $\text{Mg}^{2+}$  не оказывают сколько-нибудь существенного влияния на образование энзима, ионы  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$  в концентрации ниже  $1 \cdot 10^{-3}$  М не имеют влияния, а в более высоких концентрациях инактивируют протеазу.



## FOLIA BIOLOGICA

Tom. III. (1957) — Fasc. 1.

---

### Photoreactivation of Bacteria Irradiated with X-rays

F. HERČÍK

Institute of Biophysics, Czechoslovak Academy of Science, Brno

Received October 24, 1956

Photoreactivation is a phenomenon in which organisms irradiated by UV light suffer less damage if sufficiently exposed to visible light. Prát (1936), in a detailed paper, drew attention to the antagonistic effects of various types of radiation (v. also Prát 1950). More recently, Kelner (1949) observed photoreactivation in spores of *Streptomyces griseus* inactivated by UV radiation. Almost at the same time Dulbecco (1949) observed photoreactivation in bacteriophage of the group *Escherichia coli* which had undergone UV irradiation. He did not succeed, however, in ascertaining whether phage irradiated by X-rays was capable of photoreactivation. It was not until later that Dulbecco (1950) and in particular Watson (1950) found that bacteriophage irradiated by X-rays can be photoreactivated. The degree of reactivation, however, is small.

Latarjet (1951) observed that induction to phage formation caused by X-ray irradiation can be reversed by photoreactivation. The cells of *B. megatherium* (lysogenic strain) easily release phage following irradiation with a dose of 25,000 rep (wave-length 0.9 Å, 33 kV). If, after irradiation, they are sufficiently exposed to the light of a 500 W lamp (10–30 mins.) induction does not occur, phage does not appear and the bacteria continue to grow, although at a slower rate.

The present experiments were aimed at ascertaining whether it is possible to photoreactivate bacteria in which division has been halted by X-rays. It was evident beforehand that the degree of photoreactivation would not be high, as the processes which develop under the influence of ionizing radiation are completely different from those which develop under the action of UV radiation. The starting point was the assumption that ionizing radiation does not only evoke ionization in living matter, but also excitation (Herčík 1956). It is probable that damage to cells which develops on the basis of excitation could be reversed by the later action of visible light, i. e. photoreactivation. Support for this view is found in the communication of Watson (1950), who states that about half the energy of X-rays is dissipated in the form of excitation, so that photoreactivation can only take place in those phage particles which have been damaged by excitation. In the same way it may be expected that the cells of bacteria which have been damaged by excitation in the course of absorption of X-ray irradiation can be reactivated by visible light. It would thus be possible to differentiate between the effect of ionizing and excitation processes in elementary processes which develop in living matter irradiated by X-rays.

#### Methods

Bacteria of *Escherichia coli* (strains 5k and 3c) were transferred from a solid medium to broth and diluted to a strength of 7,000–8,000 micro-organisms/1 ml. A few ml. of this suspension were poured into a Petri dish with nutrient agar, left for two minutes and then poured off. After drying, the surface

of the dish was irradiated with X-rays and photoreactivation then carried out in half the dishes. The results were read off after 24 hours' incubation at 37° C. Survival was determined according to the number of fully grown colonies on the irradiated and non-irradiated surface. Immediately after irradiation with the X-ray tube, the controls were placed for 24 hours in the dark at 37° C. The possible effect of reactivating light was excluded by exposing the entire surface of the Petri dish, i. e. including those bacteria which had not been irradiated by X-ray and which served as controls.

Some of the experimental series were irradiated with a Siegbahn-Hadding tube, which was continually exhausted by a rotary pump. A molybdenum cathode was used and the voltage was 18.5 kV at 10 mA, without a filter except the foil on the window (Al 0.04 mm.). Irradiation was carried out at a range of 4.7 cm., with a dose of 184 r/min.<sup>-1</sup>. The second part of the experimental series was irradiated with a Chaoul tube at a voltage of 56 kV, 3 mA, 0.15 mm Cu. The distance was 1.58 cm. and the diameter of the tubus 1.5 cm., with a dose of 864 r/min.<sup>-1</sup>. The tubus touched the surface of the agar.

The doses were measured by the compensation method with a Wulf one-filament electrometer and a Taylor-Stoneburner chamber with an diaphragm measuring 0.42 cm. in diameter. The reliability of the method was tested by the uranium standard. A more detailed description of the method is given in an earlier communication (Herčík 1948).

Photoreactivation was evoked either by irradiation with a 100 W incandescent lamp at a distance of 50 cm. for 60—120 minutes or with a UV burner, the radiation of which was filtered through the glass lid of the Petri dish (distance 72 cm., time of irradiation 30 or 60 minutes). Glass 2 mm. thick allows sufficient passage for rays longer than 340 mμ (Meyer-Seitz 1942, p. 127). In the case of a tungsten filament lamp, emission is recognisable only with a wave-length of 400 mμ, with a maximum of 700 mμ (Withrow 1956, p. 159). As will be seen later, there is no difference between the reactivating effect of a tungsten filament lamp and that of a mercury vapour lamp (filtered through glass). It may therefore be assumed that in our case the active wave-length was 400 mμ.

The significance of the results was evaluated by the t-test.

### Results

Using very soft X-ray radiation (18.5 kV), reactivation experiments were carried out with one hour's irradiation with a 100 W lamp (distance 50 cm.) and doses of 920—5,520 r in *E. coli* (strain 3c). The results are given in tab. 1. For every dose, 500—700 irradiated colonies were read off. If differences with  $P < 0.05$  are taken as significant, the table shows that very soft radiation can be somewhat reactivated by

Table 1. Photoreactivation of the Effect of Very Soft X-ray Radiation in *E. coli*, Strain 3c. X-ray radiation: 18 kV, 10 mA, 184 r. m<sup>-1</sup>, Reactivated for 60 mins. by exposure to a 100 W lamp at 50 cm.

Dose r	Without photoreactivation	Photoreactivated by light	Difference	P
920	0.94	0.95	+ 0.01	0.4—0.3
1840	0.88	0.92	+ 0.04	0.2—0.1
3680	0.75	0.79	+ 0.04	0.1
5520	0.62	0.69	+ 0.07	<0.01

light only with a dose of 5,520 r, corresponding to a survival of 0.62 (in the dark). The difference in the case of smaller doses is not significant, although a certain tendency to a lesser degree of damage of the reactivated cells may be observed here also.

Somewhat better results were obtained with radiation at 56 kV. Using this voltage, four series of experiments were carried out (*E. coli*, strain 5k), with different types of photoreactivation (electric lamp or UV mercury vapour lamp) and different periods of photoreactivation (30—120 min.). For every dose, 1,000—1,700 irradiated colonies were read off.

Tab. 2 gives the results for the smaller reactivation doses (60 mins. exposure, 100 W/50 cm. and 30 mins. exposure UV/72 cm.). Two doses of X-ray irradiation

Table 2. Photoreactivation of the Effect of Soft X-ray Radiation. *E. coli*, strain 5k. X-ray radiation: 56 kV, 3 mA, 0.15 mm. Cu, 864 r. m<sup>-1</sup>.

A. Reactivated 60 mins. by exposure to 100 W lamp at 50 cm.				
Dose r	Without photoreactivation	Photoreactivated by light	Difference	P
3460	0.46	0.54	+ 0.08	0.1 - 0.05
6920	0.18	0.31	+ 0.13	≤ 0.01
B. Reactivated by UV radiation for 30 mins. at 72 cm.				
Dose r	Without photoreactivation	Photoreactivated by light	Difference	P
3460	0.46	0.67	+ 0.18	≤ 0.01
6920	0.18	0.27	+ 0.09	0.05

Table 3. Photoreactivation of the Effect of Soft X-ray Radiation by Double Dose of Light. X-ray radiation 56 kV, 3 mA, 864 r. m<sup>-1</sup>.

A. Reactivation by 100 W lamp for 120 mins. at 50 cm.				
Dose r	Without photoreactivation	Photoreactivated by light	Difference	P
3460	0.42	0.39	- 0.03	0.03
6920	0.17	0.15	- 0.02	0.6 - 0.7
B. Reactivation by UV lamp for 60 mins. at 72 cm.				
Dose r	Without photoreactivation	kV	Difference	P
3460	0.39	0.3	- 0.09	0.05 - 0.02
6920	0.15	0.13	- 0.02	0.5 - 0.7

were selected: 3,460 r and 6,920 r. Organisms of strain 5k are more sensitive than those of strain 3c, which was used in the preceding series of experiments. As seen from the table, statistically significant photoreactivation occurred in both cases.

Tab. 3 gives the results with double reactivation doses (120 mins. exposure, 100 W/50 cm. and 60 mins. exposure UV/72 cm.). In these cases photoreactivation did not occur; on the contrary, the exposed dishes showed a lower degree of survival, although this was not statistically significant.

It follows from the above experiments that the effect of 18 kV and 56 kV radiation can be reversed by photoreactivation, the result being more significant in bacteria irradiated at 56 kV. Care must be taken, however, in selecting the dose of reactivation radiation, since large doses tend to intensify the effect of X-ray radiation rather than to weaken it.

### *Discussion*

On comparing our radiation results with experiments investigating the photoreactivation of the effect of UV light, it is clear at first glance that in no case was complete reactivation achieved, but only a mild increase in the degree of survival. This result was to be expected since, as stated at the outset, the basic action of ionizing radiation on living matter differs from that of UV radiation.

It now remains to consider whether photoreactivation of X-ray irradiation can be explained on the basis of the original damage to the photoreactivated bacteria being due to excitation, while the remainder were irreversibly damaged by ionization.

It is well known that UV radiation and sometimes even visible light can free electrons from the outer electron shell. For the most part, however, only excitation occurs, when the electron, after colliding with a weak photon, becomes excited, remains in this state for some time and then returns to its basic state, at the same time emitting fluorescent radiation. In radiation rich with energy, the conditions are more complex and both excitation and ionization occur.

According to Fano (1946), the relative part of primary excitations is in inverse proportion to the energy required for ionization of the given substance. In biologically important elements, such as O, C and N, the energy dissipated in ionization of the inner shells is small as compared with the energy of the photon of X-ray radiation (Sommermeyer 1952, p. 21) and therefore, particularly in X-ray radiation with a wave-length of over 0.4 Å and photon energy of less than 30 ekV, all the energy of the photon is transmitted to the photoelectron. It might be expected that in such cases the participation of excitation would naturally be small. Where the wave-length is less than 0.4 Å and the energy of the photon is thus greater than 30 ekV, Compton's effect appears in ever increasing measure and at the same time part of the photon energy is transformed into a photoelectron, while the residue is radiated out in the form of a weaker photon. In such cases the energy of the photon is broken up and the atoms and molecules receive a weaker amount of energy, which is just sufficient for excitation but not for ionization. If these theoretical assumptions are correct, then photoreactivation ought to be greater with harder radiation, in which more excitation is present, whereas in soft radiation stimulated by a voltage of less than 30 kV, it ought to be less. Our experiments demonstrate that this is actually the case. This does not definitely show, however, that the photoreactivated cells were originally damaged only by excitation. Other evidence would have to be brought to support the assumption that radiation induced by higher voltage frees more excitations and that these excitations have a biological effect which can be reversed by photoreactivation.

Certain other circumstances are known, however, which lend support to our view. For example, experiments with bacteriophage (Dulbecco 1955) show that the site at which damage capable of reversal by photoreactivation appears, is the nucleoproteins, in particular their important component nucleic acid. This view is also supported by the experiments of Latarjet, in which he succeeded, as already stated, in carrying out photoreactivation in the presence of induction brought about by X-ray radiation, i. e. at a point in the life of the cell in which the leading part is played by nucleic acid.

How are we to explain, however, why, with soft X-ray radiation, weak photoreactivation makes its appearance only with higher doses of radiation? This might be due to the fact that with a higher dose of X-ray radiation there is a greater probability that some cells are damaged only by processes which develop as a result of excitation and in which photoreactivation can occur. A decrease in the degree of survival, i. e. the opposite of photoreactivation, following higher doses of visible

light, is evidently due to the complex nature of damage by X-ray radiation. Lennox, Luria and Benzer (1954) found that in inactivation by UV radiation and in subsequent photoreactivation, the curves for the reversal of UV radiation have the same characteristics, i. e. that the process is exactly reversible. It would appear that in the case of the effect of X-ray radiation, nothing of this kind occurs (v. also Latarjet 1951), although this could only be demonstrated by further experiments.

Photoreactivation carried out by means of an electric lamp or UV light, filtered through glass, is approximately the same in extent, so that it cannot be said that the radiation of short wave-lengths is more favourable to photoreactivation.

### *Summary*

Cells of *E. coli* were irradiated with different doses of X-ray radiation and a photoreactivation experiment carried out, using visible light of varying spectral composition in varying doses.

Cells irradiated with very soft X-ray radiation (18.5 kV) can be successfully made to undergo photoreactivation with medium radiation doses. With small doses photoreactivation does not occur.

Cells irradiated at 56 kV can be reactivated by visible light; differences in survival are highly significant.

Long reactivation exposure decreases the changes of survival, particularly with reactivation by UV light filtered through glass.

Photoreactivation of the effect of X-rays can be explained by the fact that some cells are damaged by excitation. This damage is evidently reversible by photoreactivation in contrast to damage by ionization, which cannot be reversed by photoreactivation.

### *References*

- Dulbecco, R.: Reactivation of Ultraviolet-inactivated Bacteriophage by Visible Light. *Nature* 163 : 949, 1949.
- Dulbecco, R.: Experiments on Photoreactivation of Bacteriophages Inactivated with Ultraviolet Radiation. *J. Bact.* 59 : 329, 1950.
- Dulbecco, R.: Photoreactivation. In A. Hollaender collection: *Radiation Biology*. II. p. 483. New York 1955.
- Fano, U.: *Phys. Rev.* 70 : 44, 1946. Cited by K. Sommermeyer in *Quantenphysik der Strahlenwirkung in der Biologie und Medizin*. Leipzig 1952.
- Herčík, F.: Analýza vlnového činitele s hlediska kvantově biologického. *Spisy lék. fak. M. univ. Brno* 12, (3), 1948.
- Herčík, F.: Mechanismus biologického účinku záření. *Čs. biologie* 5 : 128, 1956.
- The Mechanism of the Biological Action of Radiation. *Fol. biol. (Praha)* 2 : 193, 1956.
- Kelner, A.: Effect of Visible Light on the Recovery of *Streptomyces griseus* Conidia from Ultraviolet Irradiation Injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 35 : 73, 1949.
- Latarjet, R.: Photo-restauration après irradiation X chez une bactérie lysogène. *C. R. A. Sciences (Paris)* 232 : 1713, 1951.
- Lennox, E. S., Luria, S. E., Benzer, S.: On the Mechanism of Photoreactivation of Ultraviolet-inactivated Bacteriophage. *Biochim. biophys. acta* 15 : 471, 1954.
- Meyer, A. E. H., Seitz, E. O.: *Ultraviolette Strahlen*. Berlin 1942.
- Prát, S.: Strahlung und antagonistische Wirkungen. *Protoplasma* 26 : 113, 1936.
- Prát, S.: O vzájemném vlivu fyzikálních složek prostředí. *Biologické listy* 31 : 214, 1950.
- Watson, J. D.: The Properties of X-ray Inactivated Bacteriophage. I. Inactivation by Direct Effect. *J. Bact.* 60 : 697, 1950.
- Withrow, R., Withrow, A. P.: Generation, Control and Measurement of Visible and Near-visible Radiant Energy. In A. Hollaender: *Radiation Biology*. III. p. 125. New York 1956.

## Фотореактивизация бактерий после рентгеновского облучения

Ф. ГЕРЧИК

### *Резюме*

Клетки *Escherichia coli* облучались различными дозами лучей Рентгена, после чего производился опыт их фотореактивизации с помощью электрической лампочки и ультрафиолетового излучателя. Немедленно после облучения на чашках Петри производился опыт реактивизации или лампочкой в 100 W с расстояния в 50 см в течение 60—120 мин., или с помощью ультрафиолетовых лучей, фильтруемых через стеклянную крышку чашки Петри, с расстояния в 72 см при продолжительности облучения в 30—60 мин. Можно полагать, что в обоих случаях активная длина волны была около 40 мμ. Часть бактерий *E. coli* облучалась с помощью трубки Siegbahn-Hadding-a (18,5 kV, 10 mA, 0,04 мм Al, 184 г/мин.), вторая часть подопытных серий — с помощью трубки Chaoul-я при напряжении в 56 kV, 3 mA, 0,15 мм Cu, 864 г/мин. Дозы облучения измерялись с помощью камеры Taylor-Stoneburner-a компенсационным методом. После мягкого облучения (56 kV) возможно реактивизировать клетки с помощью видимого света в случае обеих исследуемых доз (3460 г и 6920 г). Разница в обоих случаях оказывается высоко сигнификантной. Длительное реактивирующее освещение ухудшает условия выживания, что проявлялось в особенности при реактивизации ультрафиолетовыми лучами, фильтруемыми через стекло. Оценка статистической значимости результатов производилась также с помощью пробы. Фотореактивизацию после обработки рентгеновскими лучами можно объяснить тем, что некоторые клетки бывают нарушены эксцитацией. Такое нарушение, повидимому, допускает фотореактивизацию, — в отличие от нарушений в результате ионизации, не поддающихся фотореактивизации.

## FOLIA BIOLOGICA

Том. III. (1957) — Fasc. 1.

### Ранние цитологические изменения лимфоцитарной и миелоидной составных частей мышинной селезенки после рентгеновского облучения

М. ПРАСЛИЧКА и М. ГИЛЛ

Биофизический институт ЧСАН в Брно и Гистологическо-эмбриологический институт медицинского факультета университета в Брно

Поступило в редакцию 19 X 1956

Вмешательства, оказывающие влияние на изменения кроветворного аппарата после облучения, имеют большое значение для патогенеза и терапии лучевой болезни. Для их исследования особенно хорошо подходит селезенка, содержащая лимфоидную и миелоидную составные части, — настолько чувствительные к облучению, что большая часть деструктивных изменений проходит в них еще до истечения 10-го часа после облучения.

Для сравнения влияния различных видов вмешательств на ранние гистологические изменения селезенки у мышей после облучения необходима была прежде всего подробная гистологическая оценка изменений у контрольных мышей, подвергавшихся одному только облучению. В имеющейся радиологической литературе (Warren et al. 1942, Bloom 1948) о ранних изменениях селезенки после облучения упоминают только мельком. Вопрос потребовал особого внимания, главным образом, потому, что у различных серий мышей одного и того же племени изменения селезенки после облучения развивались не одинаково.

Влияние введения наркотиков на гистологические изменения кроветворной системы после облучения у теплокровных не исследовалось. Однако известно, что большинство форм длительного наркоза после облучения оказывает вредное влияние на выживание животных (Burdick 1953, Прасличка 1954, 1955, Langendorff 1954). У амфибий, содержащихся после облучения при низкой температуре, процесс распада клеток кроветворного аппарата замедлялся (Allen Schjeide и Hochwald 1951, Patt и Swift 1948).

#### Экспериментальная часть

Предметом опыта служили мыши штамма Н, самцы и самки. Условия облучения: 180 kV, 15 mA, расстояние фокус — кожа 45 см, фильтр 1 мм Al, 0,5 мм Cu, приток 60 г/мин., общая однократная доза 500 г, что составляет LD 20—30/30 дней. Контрольные мыши только облучались. У опытных мышей непосредственно перед облучением или немедленно после него применялся наркоз, который поддерживался вплоть до умерщвления животного. Для умерщвления у животных ножницами отрезалась голова, после чего селезенка вынималась, взвешивалась, фиксировалась (10% нейтральный формалин, смесь Helly-Максимова) и заливалась в парафин. Срезы толщиной в 3  $\mu$  (5—8 серийных срезов из различных мест селезенки) окрашивались гематоксилин-эозином, лазурью II-эозином с предварительной окраской гематоксилином Delafield-a (Bloom 1948) и смесью Упп-а метиловой зелени и пиронина по Brachet (1953).

В контроле и при люминаловом и хлоралгидратном наркозе мыши умерщвлялись через 3, 5, 8, 12, 17, 24 и 30 часов после облучения, у эфирного и этанолового наркоза — через 3,

5, 8 и 12 час. после облучения. Из каждой из этих групп сравнивалось минимум по 3 препарата от опытной и от контрольной групп. Меньше препаратов было приготовлено через 1, 2, 4, 7, 10, 16 и 28 час. после облучения. В общем была произведена оценка 208 селезенки контрольных и опытных мышей в 6 сериях.

### I. Изменения в селезенке контрольных мышей

Гистологические данные отдельных облучавшихся серий невозможно было описать в одной общей сводке, несмотря на то, что все серии обрабатывались совершенно одинаково. Реакция на облучение в селезенках бывала двух типов. Наиболее резкая разница между обоими типами наблюдалась в ранних стадиях после облучения, в течение приблизительно первых 12 часов. Данный тип реакции проявлялся всегда у всех животных определенной серии, индивидуальные различия носили только количественный характер. Мы описываем оба типа постиррадиационных изменений отдельно, с обозначением «серия А» и «серия В», причем каждая из них включает диагнозы трех самостоятельно облучавшихся и обработанных серий животных.

#### *Серия А*

Непосредственно после облучения наблюдается общая гиперхромазия ядер (табл. II, рис. 10), которая через 3 часа после облучения сменяется постепенным прояснением ядерной структуры при одновременном скоплении хроматина. Распад начинается в герминативных центрах фолликулов, — с одной стороны, фрагментацией лимфоцитов, с другой стороны, дроблением цитоплазмы лимфоцитарного детрита прогрессивно увеличивается, достигая максимума через 8 часов после облучения (табл. I, рис. 3). Подобным образом, но медленнее, осуществляется распад эритробластов в красной пульпе. Они полностью исчезают между 8-ым и 24-ым часом. Фагоцитарная реакция появляется через 3 часа после облучения. В течение дальнейших стадий ее размеры возрастают, но лишь у небольшого числа селезенки она бывает полной (табл. II, рис. 5; табл. III, рис. 14).

У удаленных клеток можно было наблюдать изменения как прогрессивного характера, так и регрессивные, дегенеративные. Через 5 часов после облучения в лимфатических фолликулах наблюдалось увеличение количества лимфобластов, — повидимому, путем дифференциации из индифферентной ретикулярной ткани. В красной пульпе в этой стадии образовались многочисленные гранулопоэтические очаги, представленные гемоцитобластами, миелоцитами и метамиелоцитами, которые отсутствовали в предшествовавшей стадии, т. е. через 3 часа после облучения.

Стадия через 8 часов характеризуется регрессией. Лимфобласты в лимфатических фолликулах встречаются очень редко, гранулопоэтические очаги исчезают. У отдельных сохранившихся лимфобластов, миелоцитов и метамиелоцитов наблюдаются далеко зашедшие дегенеративные изменения (пристенный гиперхроматоз ядра, гипербазофилия или вакуолизация плазмы и т. п.).

Новая волна оживления проявляется приблизительно через 12 часов после облучения. Она характеризуется прежде всего изменениями многих ретикулярных клеток, у которых появляется крупное круглое или овальное ядро с разреженной структурой хроматина и большим, неправильным ядрышком. Цитоплазма этих клеток, — в отличие от индифферентных ретикулярных клеток, — становится базофильной. Эти изменения можно считать дифференци-



цией недифференцированной ретикулярной ткани в гемоцитобласты. Уцелевшие мелкие лимфоциты, которые через 8 часов после облучения бывали большей частью пикнотическими, содержат ныне, — так же, как и ретикулярные клетки, — крупное ядро с тонкой структурой хроматина и широкую плазматическую кайму. В еще более развившихся случаях в цитоплазме базофильных ретикулярных клеток и лимфоцитов возникает окооядерное прояснение, так что они приобретают характер плазмобластов и проплазматических клеток. Одновременно с этими изменениями распадается цитоплазма макрофагов и первоначально заглотанный ими детрит снова оказывается свободно лежащим в межклеточных щелях.

Такие же изменения, как в фолликулах, происходят и в ретикулярной ткани красной пульпы. Возникающие путем дифференциации из недифференцированной ретикулярной ткани гемоцитобласты превращаются в дальнейшем в элементы или гранулоцитарного или плазмоцитарного порядка. Так в красной пульпе возникают новые гранулопоэтические очаги, содержащие на этот раз примесь плазмобластов и проплазматических клеток.

В следующих стадиях (через 17, 24 и 30 часов после облучения) снова наступает постепенная регрессия. Гранулопоэтические очаги в красной пульпе исчезают. Плазмобласты и проплазматические клетки фолликулов претерпевают изменения, как гипербазофильность плазмы, пристенный гиперхроматоз ядра и, наконец, распад (табл. II, рис. 7).

Периодичность прогрессивных и регрессивных изменений заметна и у эозинофильных метамиелоцитов и гранулоцитов. Через 3 часа, 8 часов и 17—24 часа после облучения у них часто встречается кариоррексис. Напротив, в 5-ом, и в особенности в 12-ом часу они дифференцируются из гемоцитобластов, подобно тому как и нейтрофильные формы.

В течение гранулопоэтических волн некоторые из клеточных форм гранулопоэтического ряда dorастают до размеров гигантских клеток, которые постепенно накапливаются в красной пульпе во все более значительных количествах (табл. III, рис. 16).

Первые отдельные митотические фигуры были отмечены уже через 3 часа после облучения. В более поздних стадиях, в особенности после 12-го часа, они бывали уже многочисленны и без сколько-нибудь заметных ненормальностей.

Начиная с 8-го часа после облучения в красной пульпе накапливался железистый пигмент, преимущественно в цитоплазме макрофагов, заглотанный ими. Наблюдались индивидуальные колебания его количества (безотносительно количества выживающих эритробластов).

### *Серия В*

Препараты этой серии в отдельных стадиях количественно и качественно отличаются от серии А. Распад лимфоцитов наступает раньше и через 3 часа после облучения бывает гораздо массивнее (табл. I, рис. 2). Изменения в ретикулярных клетках и в лимфоцитах, которые в серии А наступали только в 12-м часу, здесь наблюдались уже через 3 часа после облучения и в более значительных размерах. В герминативных центрах и на периферии фолликулов бывает множество базофильных ретикулярных клеток, из которых, — в особенности по краям фолликулов, — в дальнейшем развиваются плазмобласты (табл. III, рис. 11). Лимфоциты, — опять-таки главным образом, по краям фолликулов, — приобретают крупное ядро с тонкой структурой хроматина и широкой плазматической каймой (табл. II, рис. 9), а иногда с прояснением вокруг ядра (табл. III, рис. 11). В результате этих изменений уже через 3 часа после облучения более

или менее значительные части фолликулов бывают заняты незрелыми плазматическими клетками. Дальнейшие стадии, — через 5 и 8 часов после облучения, — оказываются стационарными. Дегенеративные изменения выживающих клеток, наблюдавшиеся в серии А в 8-м часу, в этой серии не наступают (табл. I, рис. 4). Дальнейшее увеличение количества незрелых плазматических клеток бывает около 12-го часа после облучения. Некоторые фолликулы бывают потом представлены преимущественно элементами плазмоцитарного ряда (табл. II, рис. 6). Следующая стадия, — как и в серии А, — характеризуется возрастающей плазматической гипербазофильностью плазмоцитарных форм и частым наличием телец Russella (табл. III, рис. 12). Через 24 и 30 часов наступает такая же регрессия, как в серии А (табл. II, рис. 8).

Гранулопоэтические волны протекают так же, как и в серии А, но через 8 час. после облучения бывают прерваны не дегенеративными изменениями, а только стадией незначительной количественной убыли клеток гранулоэтического порядка. Особенно обширные очаги гранулопоэза можно наблюдать в 12-м часу (но всегда со значительной примесью плазмобластов и проплазматических клеток — табл. III, рис. 15).

В серии В совсем не происходит фагоцитоза клеточных обломков цитоплазмой макрофагов. Цитоплазма макрофагов разделяется на очень тонкие отростки, которые протягиваются через межклеточные щели, содержащие обломки распавшихся клеток (табл. III, рис. 13). В этих щелях и осуществляется переваривание обломков.

## II. Изменения в селезенках наркотизированных мышей

Часть мышей наркотизировалась непосредственно перед облучением, часть же — после облучения, у этанола — только после облучения (и наркоз поддерживался вплоть до умерщвления животных), у эфира и этанола — не дольше, чем до 12-го часа, у люминалового и хлоралгидратного наркоза — не дольше, чем до 30-го часа после облучения. Для наркотизации этанолом мы вводили в полость брюшины 0,2 мл 25% этанола, для хлоралгидратного наркоза — 0,2 мл 2,5% хлоралгидрата, для люминалового — 0,15 мл 2,0% натриумлюминала на 10 г веса. При эфирном, этаноловом и хлоралгидратном наркозе селезенка в большинстве случаев ни макроскопически, ни по весу не отличается от контроля. В отдельных случаях в селезенках опытных животных наблюдался застой крови, и их вес бывал больше. При люминаловом наркозе в селезенке всех опытных животных бывал значительный застой, а вес селезенки в этом случае бывал на 50—100% больше, чем в контроле.

1. *Эфирный наркоз.* Распад лимфоцитов в фолликулах через 4 часа после облучения (табл. IV, рис. 1а, б) отвечает стадии распада у контрольных животных приблизительно через 2 часа после облучения. Распад достигает вершины между 10 и 12-м часами и приблизительно равняется степени распада у контрольных животных через 8 часов после облучения. Фагоцитоз начинается через 4 часа после облучения, но еще через 13 часов после облучения в фолликулах находится множество детрита, который в контроле к этому времени бывает устранен. Гиперхроматические ядра небольших лимфоцитов проявляются часов через 7 после облучения, т. е. значительно позднее, чем в контроле.

Созревание клеток гранулоцитарного ряда начинается с заозданием, но все же это запоздание меньше, чем у начала распада лимфоцитов. Эозинофильные гранулоциты распадаются позднее, чем в контроле. Регрессивные изменения уцелевших элементов, которые в контроле появляются часов через 8 после

облучения, у подопытных животных возникают только в 10-м часу и в меньших размерах. Убыль эритробластов бывает меньше, и гигантские клетки возникают в меньшем количестве, чем в контроле.

В селезенке наркотизировавшихся до облучения животных часов через 10 после облучения начинается массовая дифференциация эритробластов из гемоцитобластов (табл. V, рис. 5а; табл. VI, рис. 8), возникновение которых из недифференцированной ретикулярной ткани можно наблюдать уже через 5—8 часов после облучения (табл. VI, рис. 7). При наркотизации после облучения дифференциация эритробластов наблюдается в значительно меньшей степени (табл. V, рис. 5б).

2. *Этаноловый наркоз.* Распад в лимфатических фолликулах начинается позднее, чем в контроле, и не достигает вершины даже через 12 часов после облучения (табл. V, рис. 3а, б). Количество обломков бывает меньше, чем в контроле, а количество уцелевших мелких лимфоцитов — больше. Через 3 часа после облучения количество уцелевших гемоцитобластов и эритробластов бывает больше, однако клетки гранулоцитарного ряда встречаются так же редко, как в контроле. Через 8 часов после облучения можно наблюдать обширные скопления гемоцитобластов, миеоцитов, метамиеоцитов и переходных форм, свидетельствующих о наличии дифференциации гемоцитобластов, превращающихся в миеоциты. Однако у большинства из этих дифференцировавшихся клеток наблюдаются дегенеративные изменения. Размеры эритропоза бывают больше, чем в селезенках мышей, наркотизировавшихся эфиром после облучения.

В 11—12-ом часу после облучения наступает регрессия, т. е. падение количества гемоцитобластов, миеоцитов и образовавшихся ранее базофильных эритробластов, а также тяжелые дегенеративные изменения этих элементов.

3. *Хлоралгидратный наркоз.* Из двух серий мышей одна реагировала в смысле серии А, вторая в смысле серии В. Распад лимфоцитов в обеих сериях наступал позднее и протекал длительнее, чем в контроле (табл. IV, рис. 2а, б). В серии А фагоцитарная реакция бывала интенсивнее, чем в контроле, и фрагменты переваривались преимущественно в цитоплазме макрофагов. В серии В переваривание фрагментов осуществляется преимущественно внеклеточно подобно тому, как в контроле. Образование клеток плазмочитарного ряда не наблюдается ни в одной из серий.

В обеих сериях, и в особенности в серии В (табл. VI, рис. 6б, 9), эритробласты оказываются более многочисленными, чем в контроле, и исчезают не так быстро. В серии В через 12 часов после облучения дифференциация ретикулярной ткани и ее превращение в гемоцитобласты бывают более значительными, чем в контроле, а очаги гранулопоза встречаются чаще. В серии А дифференциация бывает слабее, чем в контроле (табл. VI, рис. 6а), а после дифференциации клеточные элементы быстро подвергаются дегенеративным изменениям.

Таким образом, картина гистологических изменений в селезенке в серии В по сути дела отличается от селезенки серии А более значительным общим количеством выживающих клеток, в которых бывает меньше дегенеративных изменений; более значительны в них также и количество эритробластов, интенсивность гранулопоза и активность ретикулярной ткани.

Время применения хлоралгидрата — до или после облучения — не отражалось на гистологической картине селезенки.

4. *Люминаловый наркоз.* Распад клеток и переваривание клеточных обломков протекают несколько замедленнее, чем в контроле (табл. V, рис. 4а, б), и достигают вершины через 12 часов после облучения. Процесс изменений ретикуляр-

ных клеток и выживающих лимфоцитов не отличается от контроля. Превращение в плазмочитарные элементы бывало в сравнении с контролем незначительно.

Кривая количества клеток гранулоцитарного ряда имеет два подъема: в 3-ем и в 12-ом часу после облучения, после чего их количество идет на убыль.

Начиная с 3-го часа после облучения эритробластов бывает постоянно больше, чем в контроле. После 17-го часа после облучения количество эритробластов падает. Через 30 часов картина селезенки наркотизированных мышей не отличается от контроля.

*Сводка результатов.* Большинство наркотиков вызывает запаздывание начала распада лимфоцитов в сравнении с контролем и замедление его течения. Соответственно этому запаздывает также переваривание клеточных обломков, но здесь задержка бывает еще выразительнее. Больше всего распад лимфоцитов запаздывает у спирта и эфира, меньше — у хлоралгидрата, а меньше всего — у люминала.

Начало гранулопоэтической волны и кариорексиса эозинофильных гранулоцитов тоже запаздывает в сравнении с контролем, но не настолько, как распад лимфоцитов.

В отличие от контроля, при хлоралгидратном, эфирном и этаноловом наркозе не образуются незрелые плазматические клетки, при люминаловом наркозе они образуются только в незначительных количествах. Наиболее выразительная способность к дифференциации ретикулярной ткани наблюдалась при применении эфира перед облучением, хлоралгидрата (в серии В) и люминала.

В селезенках наркотизированных мышей наблюдалась дифференциация базофильных эритробластов, которой не было в контроле. Наиболее сильный эритропоэз бывал при применении эфира (перед облучением) и алкоголя (хотя он применялся после облучения). Однако через 12 часов после облучения базофильные эритробласты в селезенке алкоголизированных мышей в значительной степени подвергаются распаду. При эфирном наркозе, применяемом после облучения, эритропоэз бывает таким же, как и при других наркотиках.

### *Дискуссия*

Из приведенных описаний вытекает, что серия В реагировала и на прямые, и на неспецифические последствия облучения бурно, тогда как серия А — медленнее и умереннее. Различия гистологических картин обусловлены, повидимому, различиями в нейрогуморальной реакции организма, пораженного лучами, а не различиями самих клеток и тканей. Влияния пола и возраста животных, как и возможные скрытые инфекции были исключены. Можно предполагать различия в реактивности, обусловленные временным состоянием облучаемого животного (время дня или года, интервал после кормежки, температура окружающей среды и т. п.), или же различия в реактивности мышей той или иной серии.

Поэтому мы считаем сделанные нами наблюдения, во-первых, последствиями самого облучения, а во-вторых, проявлениями нейрогуморальной реакции в тканях, изменившихся под влиянием ионизирующего облучения. Кариорексис эозинофильных гранулоцитов и волнообразный гранулопоэз вызываются, вероятно, выделением адренокортикальных гормонов. Эти явления связаны, вероятно, с эозинопенией (Pape 1953, Wagner 1953) и с двухфазовой нейтрофилией (Jacobson с сотр. 1954), которая наблюдалась в периферической крови приблизительно через те же промежутки времени после облучения. Bloom (1948) отмечает только непрерывную деструкцию клеток гранулоцитарного ряда в костном мозге и в селезенке после облучения.

Проблемой остаются изменения в лимфоцитах и в ретикулярной ткани, после которых следуют изменения плазмоцитарного характера. В имеющейся до сих пор радиологической литературе можно найти упоминания об отдельных превращениях ретикулярных клеток после облучения в крупные лимфоциты (Murray 1948) и об увеличении ядер лимфоцитов и расширении их плазматической каймы (Scherer и Wichmann 1954). Наблюдавшиеся нами изменения лимфоцитов напоминают те, которые Frank и Dougherty (1955a, b) находили после применения неспецифических стимулов. Плазмоцитарные превращения этих клеток вызываются, вероятно, веществами белкового характера, происходящими из разрушенных тканей и вызывающими изменения в глобулиновых фракциях сыворотки уже через короткие промежутки времени после облучения (Dougherty и White 1947).

Важным фактором, играющим, вероятно, роль в патогенезе лучевой болезни, является поздняя регрессия вышеуказанных клеточных типов, а также клеток гранулоцитарного ряда. Дегенеративные изменения появляются в клетках, которые благополучно переносят непосредственные последствия облучения и производят впечатление морфологически и функционально не нарушенных клеток, напр., проявляют митотическую активность, способность к дифференциации и т. п. Их дегенерация позднее вызывается, вероятно, лейкотоксическими факторами (Rodé 1950, Edelmann 1955) или антимитотическими факторами (Müller 1956) в сыворотке подвергавшихся общему облучению животных. Более подробное объяснение этой проблемы требует дальнейших экспериментов.

В литературе можно найти многочисленные данные относительно благоприятного или неблагоприятного действия торможения ЦНС или наркоза на течение различных патологических процессов (Котляревский 1952, Полковникова 1952, Жив и Красинская 1953, Кан 1953, Вашку с сотр. 1953).

Для модификации ранних гистологических изменений селезенки после облучения могут иметь значение такие факторы, как понижение обмена, застой крови в селезенке (главным образом, при люминаловом наркозе), понижение температуры тела (при люминаловом наркозе на 3—4°) и кислородное голодание тканей. Как показал отдельный опыт, кислородное голодание после облучения вызывает небольшую задержку распада лимфоцитов, а эритробласты в красной пульпе встречаются в этом случае чаще, чем в контроле. Облучение принадлежит к таким вмешательствам, которые вызывают в организме нейрогуморальную реакцию (Langendorff 1954). Наркотики меняют эту реакцию через торможение ЦНС, а вместе с вышеуказанными факторами (кислородным голоданием, снижением температуры тела и т. п.) снижают реактивность и все проявления жизнедеятельности организма, в результате чего постиррадиационные изменения в селезенке развиваются медленнее, длительнее и качественно несколько по другому.

В селезенках наркотизированных животных не образовались плазматические клетки (за исключением отдельных случаев при люминаловом наркозе), тогда как в контроле они встречались часто. Это связано, вероятно, с запаздыванием изменений при наркозе, отодвигающим продуктивные стадии на более позднее время.

При эфирном наркозе до облучения бросалась в глаза способность гемоцитобластов, возникших путем дифференциации из ретикулярной ткани селезенки, созревая, превращаться в базофильные эритробласты. Эта способность отсутствовала, если эфирный наркоз применялся после облучения. Это связано с возможной защищенностью ретикулярной ткани от действия облучения у животных, облучавшихся в состоянии наркоза. Известна стимуляция эритропоэза после облучения в результате потери крови или кислородного голодания

перед облучением (Jacobson 1948, 1954, Rambach с сотр. 1954, Скалка 1956).

Разница между сериями А и В в реакции ретикулярной ткани на одну и ту же дозу облучения особенно значительна при хлоралгидратном наркозе, когда у серии А не было отмечено почти совсем никакой активности, а у серии В, напротив, — высокая. Значение этой разницы для дальнейшего развития лучевой болезни нами не изучалось.

#### *Резюме*

Была произведена оценка ранних гистологических изменений селезенки у 208 мышей, облучавшихся дозой в 500 г. Половина мышей только облучалась и служила в качестве контроля, вторая половина непосредственно перед облучением или сразу после облучения наркотизировалась эфиром, хлоралгидратом или люминалом. Этанол применялся только после облучения. Состояние наркоза поддерживалось вплоть до умерщвления животного, т. е. до 12-го часа после облучения (при эфире и этаноле) и до 30-го часа после облучения (при хлоралгидрате и люминале).

В селезенках контрольных мышей, кроме описываемого обычно распада лимфоцитов и эритробластов, после которого следует фагоцитоз клеточных обломков, — наблюдались и изменения прогрессивного характера: дифференциация ретикулярной ткани в клетки типа гемоцитобластов, увеличение объема ядер и цитоплазмы лимфоцитов, образование незрелых плазматических клеток. В красной пульпе наблюдалась двухфазовая волна гранулопоза и циклический кариорексис эозинофильных гранулоцитов. Клеточные обломки переваривались преимущественно внеклеточно. Течение изменений после облучения характеризовалось (кроме распада лимфоцитов и эритробластов) чередованием продуктивных стадий со стадиями покоя или же регрессии. Реакции в отдельных сериях бывали количественно и качественно разными. Эта разница отличалась закономерностью, так что можно было определить две формы деструкции селезенки после облучения. Обсуждается связь этих явлений с нейрогуморальной реакцией организма на облучение.

Все наркотики вызывают запаздывание начала распада лимфоцитов в сравнении с контролем и замедление его течения. Наиболее значительно замедление распада при спирте и эфире, несколько меньше при хлоралгидрате, а меньше всего при люминале. Соответственно с этим при всех наркотиках запаздывает и переваривание клеточных обломков, но запоздание здесь бывает еще значительнее. Появление волны гранулопоза и кариорексиса эозинофильных гранулоцитов тоже запаздывает, но меньше, чем распад лимфоцитов. При хлоралгидратном, эфирном и спиртовом наркозе, в отличие от контроля, не наблюдается образование незрелых плазматических клеток, при люминаловом же оно встречается, но в незначительном числе случаев. В селезенках наркотизированных мышей наблюдалась дифференциация базофильных эритробластов из гемоцитобластов, чего не было в контроле. Эритропоз бывает наиболее значительным при применении эфира перед облучением. Наиболее значительная способность ретикулярной ткани к дифференциации наблюдалась тоже при применении эфира перед облучением и при люминале.

Разница в развитии гистологических изменений селезенки наркотизированных и контрольных мышей объясняется нами как результат различий в нейрогуморальной реакции организма под влиянием торможения ЦНС, снижения реактивности и общей жизнедеятельности организма при наркозе.

(Табл. I, II, III, IV, V, VI)

# Л и т е р а т у р а

- Ж и в, Б., К р а с и н с к а я, С. Л.: Влияние уретана на воспалительный процесс. Бюлл. эксп. биол. мед. 6 : 48, 1953.
- К а н, Г. С.: Материалы к изучению роли нервной системы в патогенезе туберкулеза. Арх. патол. 1 : 13, 1953.
- К о т л я р е в с к и й, Л. Л.: Нарушения высшей нервной деятельности животных, вызванные разными интоксикациями и экспериментальная терапия этих нарушений. Журн. высш. нерв. деят. 2 : 4, 1952.
- П о л к о в н и к о в а, К. Л.: К вопросу о роли нервной системы в патогенезе гемолитических анемий. Арх. патол. 2 : 28, 1952.
- С к а л к а, К.: Влияние потери крови на смертность мышей после рентгеновского облучения. Fol. biol. (Praha) 2 : 116, 1956.
- A l l e n, B. M., S c h j e i d e, O. A., H o c h w a l d, L. B.: The Influence of Temperature upon the Destruction of Hematopoietic Cells of Tadpoles by X-irradiation. J. Cell. Comp. Physiol. 38 : 69, 1951.
- B l o o m, W.: Histopathology of Irradiation from External and Internal Sources. New York 1948.
- B r a c h e t, J.: The use of Basic Dyes and Ribonuclease for the Cytochemical Detection of Ribonucleic Acid. Quatr J. Microbiol. Sci. 94 : 1, 1953.
- B u r d i c k, K. H.: Effect of Anesthetic Agents on Rats Following Whole Body Irradiation. Cur. Res. Anest. Analg. 32 : 319, 1953.
- D o u g h e r t y, T. F., W h i t e, A.: An Evaluation of Alterations Produced in Lymphoid Tissue by Pituitary-adrenal Cortical Secretion. J. Lab. Clin. Med. 32 : 584, 1947.
- E d e l m a n n, A.: Toxicity of Serum from Irradiated Animals. Science 121 : 622, 1955.
- F r a n k, J. A., D o u g h e r t y, T. F.: Effect of Grated Amounts of Epinephrine on Normal and Stress Lymphocytes of Intact and Adrenalectomized Mice. J. Lab. Clin. Med. 45 : 485, 1955a.
- F r a n k, J. A., D o u g h e r t y, T. F.: The Lymphocyte Response to Various Stressors. J. Lab. Clin. Med. 45 : 876, 1955b.
- J a c o b s o n, L. O., M a r k s, E. K., G a s t o m, E. O., S i m m o n s, E. L., B l o c k, M. H.: Studium on Radiosensitivity of Cells. Science 107 : 248, 1948.
- J a c o b s o n, L. O., M a r k s, E. K., S i m m o n s, E. L., H a g e n, C. W., Z i r c l e R. E.: Effects of Total-body X-irradiation on Rabbits. II. Hematological Effects. In R. E. Zircle: Biological Effects of External X and Gamma Radiation. I. New York 1954.
- L a n g e n d o r f, H., K o c h, R.: Untersuchungen über einen biologischen Strahlenschutz. VII. Der Einfluss der Narkose auf die strahlenschädigte Maus. Strahlentherapie 94 : 411, 1954.
- M u r r a y, R. C.: The Spleen. In W. Bloom: 1948.
- M ü l l e r, J.: Influence of Ionizing Radiation on the Appearance in the Serum of Rabbits of Humoral Factors Slowing Down Cell Division. Nature 178 : 43, 1956.
- P a p e, R.: Wirkungen schwacher Röntgenbestrahlungen an den blutbildenden Organen. Strahlentherapie 91 : 108, 1953.
- P a t t, H. M., S w i f t, M. V.: Influence of Temperature on the Response of Frog to X-irradiation. Am. J. Physiol. 155 : 388, 1948.
- P r a s l i č k a, M.: Príspevok k vplyvu chloroformovej a éterovej narkózy na účinok rtg žiarenia. Čs. biologie 4 : 88, 1955.
- P r a s l i č k a, M.: Vplyv niektorých narkotík a anoxie na účinok žiarenia. Kand. dizert. práca, Brno 1954.
- R a m b a c h, W. A., A l t, H. L., C o o p e r, J. A. D.: Protective Effect of Hypoxia against Irradiation Injury of the Rat Bone Marrow and Spleen. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 86 : 159, 1954.
- R o d é, I.: Neuere Untersuchungen über die Wirkungsdauer der im Blute bestrahlter Tiere entstehenden „Leukotoxine“. Strahlentherapie 81 : 103, 1950.
- S c h e r e r, E., W i c h m a n n, K. O.: Beobachtungen über den Ablauf der Strahlenreaktion im Milzgewebe der Maus bei Anwendung der Phasenkontrastmikroskopie. Strahlentherapie 95 : 195, 1954.
- S k a l k a, K.: Vliv ztráty krve na úmrtnost myši po ozáření Röntgenovými paprsky. Čs. biologie 5 : 35, 1956.
- V a š k ů, J., P o s p í š i l, M., T u r e k, V.: Vliv funkčních stavů centrálního nervového systému na vznik a průběh experimentální tuberkulózy u králíků. Ref. na sjezdě fyziologů v Brně 1953.
- W a g n e r, H.: Milzbestrahlung und Blutmorphologie. Strahlentherapie 91 : 115, 1953.
- W a r r e n, S., D u n l a p, C. E.: Effects of Radiation on the Blood and the Hematopoietic Tissues, Including the Spleen, the Thymus and the Lymph Nodes. Arch. Pathol. 34 : 562, 1942.

## Early Cytological Changes in the Lymphocyte and Myeloid Components of Mouse Spleen Following X-ray Irradiation

M. PRASLIČKA and M. HILL

### *Summary*

#### I. Changes in the Spleen of Normal Control Mice

When evaluating the action of various protective substances influencing the effects of X-ray irradiation on the course of post-irradiation destruction, it was necessary to obtain a detailed picture of normal post-irradiation destruction of the spleen in the early stages after irradiation. For this purpose, white mice were irradiated with a total dose of 500 r (180 kV, 15 mA, focal distance = 45 cm., filter 1 mm. Al, 0.5 mm. Cu, dose rate 60 r/min.), amounting to an LD of 20—30/30 days. The spleens of the irradiated mice were fixed with 10% formol and Helly-Maximow mixture, embedded in paraffin and stained with haemotoxylin-eosin, azure II-eosin and methyl-green-pyronin. The findings in six series (104 mice in all), elaborated and evaluated independently, were basically of two types:

Group A, comprising three independent series: Apart from the usual disintegration of lymphocytes and erythroblasts, followed by phagocytosis of the fragments, which are an expression of regressive changes, changes of a progressive character were also observed. Five and 12—17 hours after irradiation, the red pulp contained numerous granulopoietic foci, formed by neutrophil and eosinophil granulocytes in all stages of development. During maturation, some myelocytes and metamyelocytes showed a pathological increase in size, ultimately forming giant cells. Eosinophil forms other than at the stage of fading granulopoiesis, i. e. three, eight and 17—24 hours after irradiation, underwent karyorrhexis. Indifferent reticular cells differentiated out 12 hours after irradiation into stem types, which in the follicles continued to give plasmoblasts and also, in the red pulp, myelocytes. Many lymphocytes also reacted in a similar way. Their nuclei increased in volume and had a fine chromatin structure and discernible nucleolus; the cytoplasmatic border also became wider, often with juxtannuclear translucidation. As a result of these changes, after 12 hours some of follicles were formed of immature cells of the plasmocytic series. At this stage the macrophages containing phagocytosed fragments disintegrated and the debris continued to be digested extracellularly. Further stages (24—30 hours) were characterised by gradual regression; the granulopoietic foci in the red pulp disappeared. The plasmocytic elements showed hyperbasophilia of the cytoplasm and hyperchromatosis of the walls of the nucleus. The surviving lymphocytes were markedly pyknotic. The giant cells which had been formed earlier disintegrated at this stage.

Group B, comprising the results of the other three series, differed from group A in a number of points. In this group, disintegration of the lymphocytes began sooner. Changes in the reticulum and lymphocytes, leading to the formation of immature plasma cells, occurred in two phases, three and twelve hours respectively after irradiation. The extent of these and likewise the extent of both granulopoietic waves, was substantially greater than in group A. Phagocytosis of the fragments was completely absent.

The above findings were taken as being the direct effect of ionizing radiation and also as the outcome of the neurohumoral response of the organism to total irradiation, which, however, took a different course in the individual series. The cause of this divergence is not yet known.



## II. Changes in the Spleen of Narcotized Mice

Substances which influence post-irradiation changes in the haematopoietic apparatus are of great importance for the pathogenesis and therapy of radiation diseases. An evaluation was therefore made of histological changes following irradiation with a dose of 500 r in mice narcotized with ether, ethanol, chloral hydrate and luminal sodium, as compared with non-narcotized mice. Some mice were narcotized immediately prior to being irradiated, others immediately afterwards; ethanol was used only after irradiation, narcosis being maintained in this case until the animal was killed (1—30 hours after irradiation). The evaluations were made from the spleens of 208 mice.

All the narcotics retarded the onset of disintegration of the lymphocytes and slowed down its course as compared with the controls. The greatest delay was obtained with alcohol and ether; it was less with chloral hydrate and least with luminal. With alcohol narcosis, disintegration reached the maximum substantially later than in the case of the other narcotics. With all narcotics, digestion of the fragments is also delayed, in proportion to disintegration, although in this case the degree of protraction is still greater. The onset of the granulopoietic wave and karyorrhexis of the eosinophil granulocytes is delayed, but to a lesser degree than disintegration of the lymphocytes. With chloral hydrate, ether and alcohol narcosis, there is no formation of immature plasma cells (cf. controls) and with luminal narcosis formation is very slight. In the spleen of narcotized mice, differentiation of the basophil erythroblasts from the stem cells was observed; in the control spleens this was absent. Erythropoiesis is greatest following ether, administered prior to irradiation, and following alcohol, although this was not administered until after irradiation. The basophil erythroblasts in the spleen of alcoholized mice disintegrate on a large scale, however, after 12 hours.

The greatest differentiation capacity in the reticulum was observed following the use of ether, administered before irradiation, and after luminal. In these cases it was greater than in the control spleens.

The differences in the development of histological changes in the spleen of narcotized and control mice are explained as being the consequence of a different neuro-humoral reaction of the organism, due to inhibition of the central nervous system, decreased ability to react and a reduction in the vital activity of the organism as a whole under narcosis.

(Plates I, II, III, IV, V, VI)

---

### Табл. I.

Рис. 1. Лимфатический фолликул серии А через 3 часа после облучения. Начало распада лимфоцитов. Отдельные лимфобласты в герминативном центре.

Рис. 2. Лимфатический фолликул серии В через 3 часа после облучения. Значительный распад лимфоцитов. В герминативном центре группы крупных базофильных ретикулярных клеток с пузырькообразными ядрами. Небольшие лимфоциты с тонкой структурной хроматиной.

Рис. 3. Максимум распада лимфоцитов в серии А через 8 часов после облучения (область герминативного центра). Небольшие, веретенообразные ретикулярные клетки.

Рис. 4. Область герминативного центра серии В через 8 часов после облучения. Характерные скопления крупных ретикулярных клеток с пузырькообразным ядром и базофильной цитоплазмой.

Табл. II.

Рис. 5. Лимфатический фолликул серии А через 12 часов после облучения. Клеточные обломки заглотаны. Пикнотические уцелевшие лимфоциты. Мелкие, веретенообразные или трех-гранные ретикулярные клетки.

Рис. 6. Лимфатический фолликул серии В через 12 часов после облучения. Детрит в межклеточных щелях. Фолликул образуется преимущественно проплазматическими клетками и плазмобластами. Лимфоциты с крупным ядром и редкой структурой хроматина.

Рис. 7. Лимфатический фолликул серии А через 24 часа после облучения. Пикнотические лимфоциты и клетки плазмочитарного ряда.

Рис. 8. Лимфатический фолликул серии В через 24 часа после облучения. Одни только клетки плазмочитарного ряда.

Рис. 9. Серия В через 3 часа после облучения. Группа лимфоцитов с тонкой структурной хроматина в ядре и с увеличением количества цитоплазмы. Местами они тесно прилегают друг к другу, так что границы клеток сливаются.

Рис. 10. Серия А через 3 часа после облучения. Часть фолликула, соответствующая части на рис. 9. Гиперхроматизация ядер лимфоцитов.

Табл. III.

Рис. 11. Периферическая часть фолликула. Тот же препарат, что и на рис. 9. Группа плазмобластов, проплазматических клеток и увеличенных лимфоцитов.

Рис. 12. Часть лимфатического фолликула серии В через 16 часов после облучения. В элементах плазмочитарного ряда местами заметны тельца Russell-a.

Рис. 13. Область бывшего герминативного центра серии В через 12 часов после облучения. Распад цитоплазмы макрофагов и внеклеточное переваривание обломков.

Рис. 14. Фолликул серии А через 12 часов после облучения. Клеточный детрит в цитоплазме макрофагов.

Рис. 15. Очаг гранулопоза и незрелые плазматические клетки у трабекула (серия В через 12 часов после облучения).

Рис. 16. Группа гигантских клеток в красной пульпе (серия В через 24 часа после облучения).

Рис. 1—8: увеличение 375 ×, рис. 9—16: увеличение 950 ×.

Табл. IV.

Рис. 1а — эфирный наркоз после облучения, 1б — контроль. Лимфатические фолликулы через 4 часа после облучения. В контрольной селезенке значительная степень распада лимфоцитов, в опытной отдельные клеточные обломки.

Рис. 2а — хлоралгидратовый наркоз, 2б — контроль. Лимфатические фолликулы через 12 часов после облучения. Максимум распада в селезенках наркотизированных мышей. В контроле большая часть клеточных обломков уже переварена.

Табл. V.

Рис. 3а — этаноловый наркоз, 3б — контроль. Лимфатические фолликулы через 12 часов после облучения. В контрольной селезенке большая часть клеточного детрита уже переварена, в опытной еще не наступил максимум распада.

Рис. 4а — люминаловый наркоз, 4б — контроль. Лимфатические фолликулы через 17 часов после облучения. В селезенке наркотизированной мыши все еще находятся клеточные обломки, в контрольной они уже за небольшими исключениями переварены.

Рис. 5а — эфир перед облучением, 5б — эфир после облучения. Красная пульпа через 12 часов после облучения. При применении эфира перед облучением количество эритробластов бывает значительно больше.

Табл. VI.

Рис. 6а — хлоралгидрат, серия А, 6б — хлоралгидрат, серия В. Красная пульпа через 16 часов после облучения. В серии А только отдельные эритробласты, в серии В — множество эритробластов, гемоцитобластов и базофильных ретикулярных клеток.

Рис. 7. Эфир перед облучением. Красная пульпа через 5 часов после облучения. Кроме эритробластов наблюдаются многочисленные базофильные ретикулярные клетки и гемоцитобласты.

Рис. 8. Эфир перед облучением. Красная пульпа через 12 часов после облучения. Многочисленные базофильные эритробласты. Гемоцитобласты отсутствуют.

Рис. 9. Хлоралгидрат, серия В. Красная пульпа через 16 часов после облучения. Группа гемоцитобластов с пузырькообразными ядрами и базофильных эритробластов.

Рис. 10. Люминал. Красная пульпа через 12 часов после облучения. Очаг гранулопоза с многочисленными миелоцитами и метамиелоцитами.

Рис. 1—6: увеличение 375 ×, рис. 7—10: увеличение 950 ×.

## FOLIA BIOLOGICA

Tom. III. (1957) — Fasc. 1.

---

### Increased Tolerance of Heterografts in Newborn Birds

V. HAŠKOVÁ and M. HAŠEK

Institute of Biology, Czechoslovak Academy of Science, Department of Experimental Biology and Genetics, Praha

Received November 11, 1956

The aim of the present work was to ascertain how heterografts survive in newly hatched birds and whether the simultaneous injection of isolated tissue cells from the donor would have an effect on the survival of the grafts. In order that the most effective cell suspension should be used, a suspension of spleen cells or bone marrow was taken for the injections, as a large part of these could proliferate further in the recipient.

#### Methods

*Skin grafting:* A testing system which had proved satisfactory for grafting from old donors was used. Skin from the wattle and legs of an adult fowl was transferred to Leghorn white chicks and Peking ducklings within 20 hours after they had hatched out. This skin is the most satisfactory for transplantation purposes as it is thinner and more homogenous than the feathered skin of a fully grown donor. The graft does not wrinkle and it is sufficient to use collodion only, without suturing. The finally healed transplant differs considerably in appearance from the normal skin so that healing and the survival of the graft on the donor can be observed without any difficulty. When evaluating the life of the graft, the number of days following transplantation on which the first macroscopic signs of regression in the primarily healed graft are given (change of colour, drying of the surface or prominence of the graft and inflammatory reaction) and the day on which the whole graft falls off.

*Preparation and injection of isolated cells:* Spleen tissue cooled in an ice bath was removed from the capsule and homogenised by hand in a glass homogenizer or pressed through a platinum mesh, mixed with the same volume of Krebs-Ringer phosphate. After centrifuging for 3–5 minutes at approximately 70 G, the sediment was suspended in Krebs-Ringer phosphate containing 10 i. units of heparin per ml. After 10 minutes the suspension was injected intravenously into birds which had hatched out not more than 20 hours previously, in amounts of 0.1–0.4 ml. containing a known number of cells, which had been determined in a Bürker chamber. Bone marrow was collected, immediately after killing the donor, into sterile Krebs-Ringer phosphate with heparin (10 i. units/1 ml.), suspended by a hypodermic syringe, gently centrifuged so as to separate the fat and injected.

*Determination of blood chimera:* the 2.5–3 % blood cell suspensions were tested by means of hen antisera against guinea-fowl and turkey blood cells in titres of 1 : 64 and 1 : 128 and of duck antiserum against goose blood cells (1 : 256). The tests were carried out in agglutination test-tubes. The blood cells, together with the antiserum, were read off after 15 minutes at room temperature, then gently centrifuged and again read off; they were then shaken for 30 minutes and read off a third time. In every case a microscopic control was carried out.

*Immunisation:* Ducks were immunised at the age of exactly eight weeks, with four doses of 1.5 ml. goose blood on alternate days (collected on the fifth day after the last injection) and reimmunisation was carried out at 13 weeks with four doses of 4 ml. goose blood administered intravenously on alternate days. The blood was collected on the fifth day.

*Agglutination tests:* The reaction of two drops of serum stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  and mixed and diluted after thawing, and of one drop of a 50 % suspension of erythrocytes washed three times in physiological saline was read off after 60 minutes at room temperature. Incomplete antibodies were determined by the reaction in 20 % equine albumin (Dunsford et al. 1953).

No. of bird	First macroscopic signs of destruction (days)	Total destruction (days)
2517	8	17
2518	8	13
2519	8	17
2520	8	15
2521	8	13
2522	8	13
2523	8	13
2524	9	13
2525	8	15
2526	8	13
670	10	13
674	10	13
676	9	10
675	9	10
668	9	10

Tab. 1a. Survival of Turkey Grafts made to Chicks within 20 Hours after Hatching

No. of bird	No. of cells injected	First macroscopic signs of destruction (days)	Total destruction (days)
401	$124 \times 10^6$ i. v.	10	18
402	$124 \times 10^6$ i. v.	8	10
403	$124 \times 10^6$ i. v.	8	10
405	$124 \times 10^6$ i. v.	20	26
407	$124 \times 10^6$ i. v.	20	22
413	$124 \times 10^6$ i. v.	8	chick died
404	$124 \times 10^6$ i. v.	8	14
	part s. c.		
409	$124 \times 10^6$ i. v.	8	10
411	$124 \times 10^6$ i. v.	15	17
416	$124 \times 10^6$ i. v.	11	12
408	$62 \times 10^6$ i. v.	10	20
418	$186 \times 10^6$ s. c.	12	14
412	$155 \times 10^6$ s. c.	18	20
415	$93 \times 10^6$ s. c.	8	18

Tab. 1b. Survival of Turkey Grafts in One-day-old Chicks with Simultaneous Injection of Suspension of Isolated Turkey Spleen Cells

No. of bird	First macroscopic signs of destruction (days)	Total destruction (days)
2501	10	15
2502	8	13
2503	8	13
2504	8	10
2505	8	13
2506	8	13
2507	12	17
2508	8	13
2509	8	13
2510	8	15
2511	8	15
2512	8	13
2513	8	12
2514	10	13
2515	8	13
2516	8	13

Tab. 2a. Survival of Guinea-fowl Grafts Transferred to Chicks within 20 Hours after Hatching

No. of bird	No. of injected cells	First macroscopic signs of destruction (days)	Total destruction (days)
1701	$152 \times 10^6$ i. v. bone marrow	18	26
1703	$152 \times 10^6$ i. v.	15	26
1702	$95 \times 10^6$ i. v.	7	12
1705	$190 \times 10^6$ i. v.	10	14
1708	$114 \times 10^6$ s. c. (spleen)	7	14

Tab. 2b. Survival of Guinea-fowl Grafts in One-day-old Chicks with Simultaneous Injection of Bone Marrow or Suspension of Guinea-fowl Spleen Cells

### Results

Heterografts from the wattle of an adult turkey and a fully grown guinea-fowl, made within 20 hours of hatching, in chicks begin to show macroscopically evident signs of regression on an average between the eighth and ninth day (turkey grafts:  $8.53 \pm 3.0.1919$ ; guinea-fowl grafts:  $8.3 \pm 3.0.284$ ). If donor blood cells are injected

at the same time, destruction begins on an average between the eleventh and twelfth day (turkey grafts:  $11.7 \pm 3.1.23$ ; guinea-fowl grafts:  $11.4 \pm 3.2.20$ ). The difference between the group which received the injection and those which did not cannot be demonstrated statistically, or it is on the border of demonstrability (turkey grafts:  $t = 1.395$ ,  $P > 0.1 < 0.2$ ; guinea-fowl grafts:  $t = 2.091$ ,  $P < 0.05 > 0.02$ ). Tabs. 1 and 2 give the day on which the first macroscopic signs of regression were observed (inflammatory reaction, drying of the surface, change in colour) and the day on which the residue of the graft fell off. Fig. 1 gives a comparison of the length of life of the grafts (the values marked are the averages between the day when the first signs of regression were observed and the day on which the graft actually fell off).

The results of transplantation in newly hatched ducklings show that regression of normal skin heterografts from the goose leg begins between the 10th and 11th day

No. of bird	No. of injected cells	First macroscopic signs of destruction (days)	Total destruction (days)
1014	—	15	17
1016	—	9	11
1021	—	9	11
1022	—	9	11
1009 = 254	$46 \times 10^6$ i. v.	32	42
1013 = 253	$92 \times 10^6$ i. v. + $184 \times 10^6$ s. c.	29	42
1018 = 255	$92 \times 10^6$ i. v. + $184 \times 10^6$ s. c.	29	42
1015	$69 \times 10^6$ i. v. + $184 \times 10^6$ s. c.	29	42
1019 = 256	$46 \times 10^6$ i. v.	29	42
1025	$46 \times 10^6$ i. v.	11	15
1026 = 258	$46 \times 10^6$ i. v. + $20 \times 10^6$ s. c.	21	30

Tab. 3. Survival of Goose Skin Grafts on Newly Hatched Ducks following Injection of Isolated Goose Spleen Cells. Transplantation from Goose's Leg carried out on 1st Day

No. of bird	Titre		
	After 1st immunisation	After reimmunisation	In protein medium
254	0	0	0
253	0	0	0
255	4	2	0
256	0	0	0
258	2	2	4
Controls:			
233	16	64	
234	128	512	
235	16	128	
236	32	256	

Tab. 4. Results of Immunisation with Goose Blood in Ducks following Injections of Isolated Goose Spleen Cells

( $10.5 \pm 3.1.16$ ). The injection of isolated goose spleen cells postponed the commencement of regression to the 25th day ( $24.9 \pm 3.2.47$ ). The influence of the injection is therefore highly significant ( $t = 5.27$ ,  $P < 0.001$ ).

Ducks to which spleen cells are administered after hatching also tolerate blood cell antigens. At the age of eight weeks, when immunised with goose blood, they do not respond by forming antibodies (tab. 4), not even incomplete antibodies. When these

ducks and a series of control ducks were given heterografts from the leg of a goose again in no case did these survive longer in the experimental birds than in the controls.

In chicks and ducklings which had received injections, erythrocytes of the donor species were not found in a specimen of peripheral blood after 7—21 days.

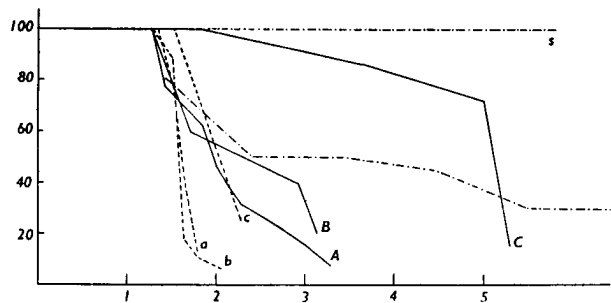


Fig. 1. Comparison of the Survival of Homografts and Heterografts in Newly Hatched Chicks and Ducklings  $x$ : time in weeks following grafting,  $y$ : percentage of surviving grafts.  $a$  = survival of heterografts from turkey wattle in newly hatched chicks,  $b$  = survival of heterografts from guinea-fowl wattle in newly hatched chicks,  $c$  = survival of heterografts from goose's leg in newly hatched ducklings,  $A, B, C$  = survival of same heterografts with simultaneous injection of tissue cells,  $r$  = curve of survival of normal homografts in newly hatched chicks (Cannon, Weber and Longmire 1954),  $s$  = survival of homografts in newly hatched ducklings (Hašková 1957).

### Discussion

It follows from the above results that heterografts transferred to newly hatched chicks and ducks never survive permanently, as some

homografts do. A comparison is made in fig. 1. Whereas some homografts in one-day-old chicks (Cannon, Weber and Longmire 1954) and all homografts in newborn ducks (Hašková 1957) still survived in the fifth week, none of the heterografts observed still survived at that period.

The results likewise show that the period when the organism is capable of adapting itself to foreign cells depends on the degree of taxonomic difference of the donor and recipient. In newly hatched chicks to which heterografts were transferred, prolonged survival was never found in spite of the fact that some birds were still in the adaptive period for homografts. Homografts take and continue to survive in all ducks, but with heterografts the same does not occur.

Following simultaneous injections, in which entrance of the antigen into the recipient is more rapid, slight, statistically non-significant prolongation of the average period of survival of grafts is found. A few individual birds, however, show slight signs of tolerance (chicks 405 and 407). This trace is fully confirmed in ducks, in which duration of the adaptive period is longer (Hašková 1957). Following the simultaneous injections, the survival of goose heterografts is statistically highly significantly prolonged. A general comparison shows that the adaptive period and its culmination have no absolute delimitation but that they involve a developmental process of the cells which participate in immunity response, which is dependent on the conditions under which it takes place. The quantitative aspect plays a part not only in the degree of immunological tolerance, but probably also in circumscribing the period in which adaptation to foreign cells can still be evoked.

In no bird which had received an injection of spleen or bone marrow cells was even a transitory appearance of an interspecific blood chimera observed. An intraspecific blood chimera in the adaptive period develops by the natural route in bovine twins (Owen 1945), sheep (Stormont et al. 1953) and man (Dunsford et al. 1953) and has been produced experimentally by intravenous injections in rat embryos (Ripley 1953, cited by Owen 1954) and by embryonal parabiosis in chicks (Billingham et al. 1956). A similar blood chimera has also been demonstrated following lethal irradiation (Ford et al. 1956, Lindsley et al. 1955). The development of an interspecific blood chimera in the adaptive period has been demonstrated only after embryonal parabiosis between turkey and hen (Hraba 1956) and following irradiation a rat blood chimera was obtained in mice (Ford et al. 1956, Nowel et al. 1956, Makinodan 1956) and a hen blood chimera in turkeys (Hašek). It is possible that in order to produce a heterologous blood chimera, it will be necessary in our experimental conditions to damage, at least partially, the haemopoietic cells of the recipient. This question will have to be resolved in further experiments. Nevertheless, the injection of a suspension of spleen cells produces a total suppression of agglutinin formation.

#### *Summary*

In contrast to homografts, skin heterografts never survive on newly hatched chicks and ducks. Direct transfer, therefore, does not lead to immunological tolerance of their antigens. If newly hatched birds are injected with spleen or bone marrow cells from the same donor, the survival of goose heterografts on ducks shows statistically significant prolongation. In chicks, the time of survival of guinea-fowl heterografts is not significantly prolonged.

A blood chimera was not found in birds injected with heterologous spleen or bone marrow cells, but the suppression of the formation of immune agglutinins in ducks injected with goose spleen cells is highly significant.

The communication discusses the limits of the adaptive period with reference to varying distant foreign cells and.

#### *References*

- Billingham, R. E., Brent, L., Medawar, P. B.: Quantitative Studies on Tissue Transplantation Immunity. III. Actively Acquired Tolerance. *Philosoph. Transactions Royal Soc., London, ser. B.*, 239 : 357, 1956.
- Cannon, J. A., Weber, R. A., Longmire, W. P. Jr.: Factors Influencing the Survival of Successful Skin Homografts in the Chicken. I. Effects of Varying Age of Donor and Recipient. *Ann. Surg.* 139 : 468, 1954.
- Dunsford, I., Bowley, C. C., Hutchinson, A. M., Thompson, J. S., Sanger, R., Race, R. R.: A Human Blood-group Chimera. *Brit. Med. J.* 2 : 81, 1953.
- Ford, C. A., Hamerton, J. L., Barnes, D. W. H., Loutit, J. F.: Cytological Identification of Radiation-chimaeras. *Nature* 177 : 452, 1956.
- Hašek, M.: The Influence of Intra-embryonal Injection of Foreign Blood on the Formation of Antibodies. II. Observation of Reactivity in Ducks, Geese and Guinea-fowl. *Fol. biol. (Praha)* 2 : 48, 1956.
- Hašková, V.: Adaptivní etapa k cizorodým antigenům v ontogenesi kachen. *Čs. biologie* 6, 1957 (in press).
- Hraba, T.: Immunological Behaviour of Embryonal Parabionts between Turkey and Hen. *Fol. biol. (Praha)* 2 : 165, 1956.
- Lindsley, D. L., Odell, T. T. Jr., Tausche, F. G.: Implantation of Functional Erythropoietic Elements Following Total-body Irradiation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 90 : 512, 1955.
- Makinodan Takashi: Circulating Rat Cells in Lethally Irradiated Mice Protected with Rat Bone Marrow. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 92 : 174, 1956.

Nowell, P. C., Cole, L. J., Habermeyer, J. G., Roan, P. L.: Growth and Continued Function of Rat Marrow Cells in X-radiated Mice. Cancer Res. 16 : 258, 1956.  
Owen, R. D.: Transplantation Bull. 1 : 83, 1954.  
Stormont, C., Weir, W. C., Lane, L. L.: Erythrocyte Mosaicism in a Pair of Sheep Twins. Science 118 : 695, 1953.

## Повышение совместимости гетеротрансплантатов у новорожденных животных

В. ГАШКОВА и М. ГАШЕК

### Резюме

Гетеротрансплантаты из складки кожи взрослой индейки или складки кожи взрослой цесарки, пересаженные цыплятам в течение первых 20 часов после выклеывания, начинают проявлять заметные и макроскопически признаки деструкции в среднем между 8-м и 9-м днем (индюшечьи трансплантаты:  $8,53 \pm 3.0,1919$ ; трансплантаты от цесарок:  $8,3 \pm 3.0,284$ ). При одновременном вприскивании клеток селезенки донора макроскопически заметная деструкция начинается в среднем между 11-м и 12-м днем (трансплантаты от индейки:  $11,7 \pm 3.1,23$ ; трансплантаты от цесарки:  $11,4 \pm 3.2,20$ ). Разница результатов со вприскиваниями и без них статистически не доказуема или находится на границах доказуемости (трансплантаты от индюшки:  $t = 1,395$ ,  $P > 0,1 < 0,2$ ; трансплантаты от цесарки:  $t = 2,091$ ,  $P < 0,05 > 0,02$ ). На табл. 1 и 2 приводится день проявления первых макроскопических признаков деструкции и день, когда слущивался остаток трансплантата. На графике 1 мы сравниваем показатели длительности выживания трансплантатов (нанесённые показатели представляют среднее арифметическое между днем появления первых признаков деструкции и днем отпадения трансплантата). Результаты опытов трансплантации у свежевylупившихся утят показывают, что нормальные гетеротрансплантаты кожи с ноги начинают разрушаться между 10-м и 11-м днем ( $10,5 \pm 3.1,16$ ). Однако вприскивания клеток, изолированных из гусиной селезенки, отодвигали начало деструкции на 25-ый день ( $24,9 \pm 3.2,47$ ). Таким образом, влияние инъекции оказывается высоко сигнификантным ( $t = 5,27$ ,  $P < 0,001$ ).

У уток, которым после выклеывания вводились клетки селезенки, проявляется сближение и по отношению к антигенам кровяных телец. В возрасте 8 недель утки при иммунизации гусиной кровью не реагируют ни образованием антител, ни образованием неполных антител (табл. 4). Этим уткам и серии контрольных уток мы уже во взрослой стадии снова пересаживали трансплантат с гусиной ноги. Однако он ни в одном случае не выживал дольше, чем в контроле.

В отличие от гомотрансплантатов кожные гетеротрансплантаты у свежевylупившихся цыплят и утят никогда устойчиво не принимаются. Если свежевylупившимся утятам одновременно с пересадкой вприснуть клетки селезенки или костного мозга того же донора, то у уток в адаптивном этапе (Гашкова 1957) можно значительно продлить выживание гетеротрансплантата.

Мы не наблюдали кровяной химеры у животных, которым делались вприскивания. В статье обсуждаются границы адаптивного этапа для различных чужеродных клеток и встречаемость кровяного химеризма, создающегося в течение адаптивного этапа или в результате смертельного облучения лучами X.



## FOLIA BIOLOGICA

Tom. III. (1957) — Fasc. 1.

### К вопросу деления ядер при регенерации скелетной мышцы кролика

В. ПУЖА

Военно-медицинская академия Я. Е. Пуркине, кафедра биологии, Градец Кралове

*Поступило в редакцию 25 X 1956*

В литературе по вопросам клеточного деления при регенерации мышц или при эмбриональном миогенезе встречается и такой взгляд, что мышечные ядра делятся путем амитоза или фрагментации, и такой, что они делятся путем митоза. Авторы, которые описывают случаи митоза, или полагают, что митоз встречается только в ранних стадиях эмбрионального миогенеза, или допускают его и в более поздних стадиях у мало дифференцированных элементов. Заварзин (1938а, б) и Хейсина (1948), исследовавшие регенерацию мышц, находили митоз только в миообластах, тогда как в более дифференцированных элементах встречали только амитоз.

Мы исследовали тип клеточного деления при регенерации скелетных мышц у кроликов и находили как митоз, так и амитоз. Каждый из этих способов деления имеет свое место и свой период наибольшей встречаемости. В своей работе мы даем попытку объяснения этого явления на основе наблюдения, что в регенерирующей ткани протекает целый ряд биохимических процессов, различных по силе и качеству в течение различных периодов. Импульсом для этого нашего предположения послужили новейшие работы, посвященные биохимии регенерации.

#### *Материал и методика*

У 36 кроликов часть четырехглавой мышцы бедра вырезалась так, чтобы брюшко мышцы не было полностью пересечено. Через определенные промежутки времени (со 2-го по 130-ый день) кролики убивались, и часть раны в мышце фиксировалась формалином, жидкостью Нелли, Bouin-a или Zenker-a. Срезы в 7—10  $\mu$  толщиной окрашивались железным гематоксилином Гайденгайна с эозином, с помощью реакции по Фельгену, по van Gieson-у и по методу Паппенгайма.

#### *Собственные наблюдения*

В первые дни после операции преобладают изменения дезинтегрирующего характера. В пересеченных волокнах ядра бывают расположены центрально и представляются более овальными, крупными и светлыми. Уже на 5-ый—6-ой день после операции можно видеть интенсивное амитотическое деление этих ядер: внутри ядра образуется перепонка, разделяющая его на две приблизительно одинаковых части. Деление протекает, повидимому, очень быстро, так как встречаются целые цепочки очень близко друг к другу расположенных ядер. Эти скопления находятся преимущественно в пересеченных волокнах, но встречаются и в нераненых, непосредственно вблизи раны. Делящиеся ядра встречаются и в значительно дезинтегрированных волокнах (рис. 1). Нарушен-

ные волокна по концам расширяются, и делящиеся ядра образуют здесь целые группы (рис. 2). Кроме деления перепонкой встречаются и случаи нормального, классического амитоза (рис. 3). В этот период нам не удавалось найти ни одной митотической фигуры — при значительном, как было уже указано, количестве различных форм амитоза в этих препаратах.

С цитологической точки зрения интересен период через 9 дней после операции. Здесь возникают мышечные почки, содержащие мелкозернистую саркоплазму и группы ядер. Некоторые из них проявляют несомненные признаки возникновения через стадию перепонки. Ядра бывают бедны хроматином и располагаются в нескольких слоях друг над другом. Поэтому на фотографии (рис. 4) они представляются более темными. К обеим почкам на этом снимке прилегают митотически делящиеся миобласты, которые, повидимому, отпочковались от них. Микрофотография рис. 5 показывает небольшую группу свободно лежащих клеток непосредственно по соседству от нарушенного волокна. Три миобласти сняты в различных фазах митоза. Стадии митоза мышечных элементов — миобластов — показывают и следующие снимки (рис. 6, 7, 8 и 9) так, как мы нашли их в препаратах, сделанных на 9-ый день после операции. Во всех случаях митоз наблюдался в свободных клетках, миоблестах, и только один раз (рис. 10) мы нашли митоз на конце мышечного волокна. Не исключено однако, что это был митоз в только что отделившемся миоблесте, тем более, что волокно вблизи этого образования было срезано наискось. Но и в этот период встречаются ядра, и даже ядра миобластов, которые делятся перегородкой. Миобласти с амитотически делящимися ядрами бывают более крупные, сравнительно длинные, а в некоторых случаях можно говорить и о примитивных, т. е. о двуждерных миосимпластах (рис. 11). Поскольку можно судить на основании наших статических изображений, тип клеточного деления оказывает влияние на дальнейшие судьбы миобластов. Если ядро делится митотически, то возникают опять-таки миобласты. После амитотического деления ядра следует не разделение всей клетки, а возникает многоядерное образование — миосимпласт — а позднее многоядерное мышечное волокно.

В более поздних стадиях, — на 20-ый день после операции, — можно видеть уже новообразованные мышечные волокна. Они проходят волнообразно. В их саркоплазме уже имеются как миофибриллы, так и поперечная полосатость. Кроме волокон встречается незначительное количество миобластов и миосимпластов. В перимизии, окутывающем волокна, встречаются зрелые фиброциты. Концы новообразованных мышечных волокон, врастающих в соединительную ткань, постепенно расширяются и утрачивают свою структуру. В их однородном или мелкозернистом содержимом находятся группы пузырькообразных ядер, в центре которых часто можно видеть перегородку (рис. 12). Случаев митоза мы в этот период не встречали.

Через более продолжительные промежутки времени после операции (40—130 дней) наблюдается аналогичная и все более приближающаяся к норме картина. Однако волокна бывают окружены соединительной тканью, что противоречит наблюдениям Rovati (1953), Студитского и Стригановой (1951). Разрастание соединительной ткани и неполное возмещение мышечных волокон при наших опытах мы объясняем тем, что мы удаляли сравнительно большую часть мышцы (весом до 3,5 г).

### *Дискуссия*

При регенерации мышцы амитоз представляет преобладающий способ ядерного деления. Однако в определенный период регенерации (на 9-ый день после операции) мы находили множество митотических фигур, локализованных так

что почти невозможно сомневаться в их узкой связи с делящимися амитотически ядрами мышечных почек. Изучение нашего материала показывает, что митотическое деление происходит и в таких ядрах, которые возникли путем амитоза, — вопреки утверждениям некоторых цитогенетиков, которые не допускают такой возможности.

Мы попытались выяснить причины чередования амитотического и митотического деления. Наиболее приемлемой из ряда рабочих гипотез нам кажется такое объяснение чередования этих двух типов клеточного деления, которое исходит из выразительных биохимических изменений в течение различных фаз регенерации. Исследуя регенерацию печени, Lang (1952) доказал, что дезоксирибонуклеотиды образуются только при делении клеток. Tsuboi с сотр. (1954) независимо от Ланга, но на таком же материале и практически при тех же условиях опыта доказали зависимость дезоксирибонуклеиновых кислот (ДРНК) от типа клеточного деления. Они утверждают, как и Ланг, что ДРНК синтезируются только при митотическом делении. Мы же полагаем, что амитотическое деление в первый период заживления осуществляется потому, что ткань в этот период бывает богата ДРН кислотами. После истощения запасов ДРНК в результате усиленного амитотического деления наступает период митоза, в течение которого ткань снова обогащается ДРН кислотами. Наш взгляд, опирающийся прежде всего на работы по биохимии, соответствует и открытиям Дмитриевой (1954), которая производила гистохимические исследования содержания ДРНК при регенерации поперечнополосатых мышц у крысы. Она приводит данные, что содержание ДРНК начинает падать уже в течение первых 24 часов после операции, тогда как на 6-ой и 7-ой день (т. е. в период, когда Игнатьева (1954), исследовавшая регенерацию скелетных мышц у крысы, находила митозы) — содержание ДРНК резко повышается. Таким образом, и эта работа подтверждает правильность нашего предположения.

#### *Резюме*

1. При регенерации скелетных мышц кролика преобладает амитоз. Митоз появляется в период наибольшего развития миобластической фазы, — в нашем опыте на 9-ый день после операции.

2. При митотическом делении миобластов возникают опять-таки миобласты, но после амитоза миобласты дифференцируются далее и из них возникают миосимпласты.

3. В вопросе чередования амитоза и митоза автор защищает взгляд, что в результате быстро осуществляющегося амитотического деления исчерпывается запас дезоксирибонуклеиновых кислот (ДРНК), после чего клетки делятся митотически. Так запас ДРНК дополняется до требуемого уровня, как вытекает из работ некоторых авторов, которые доказали, что при митозе осуществляется синтез ДРНК. По истечении периода митоза снова было найдено амитотическое деление ядер.

4. Чередование амитотического и митотического деления это обычное явление при регенерации мышцы. Был найден амитоз, предшествовавший митозу при делении одного и того же ядра, хотя формальные генетики не допускают такой возможности в интересах теории индивидуальности хромосом.

(Табл. VII, VIII)

Л и т е р а т у р а

- Д м и т р и е в а, Е. В.: Распределение нуклеиновых кислот в волокнах скелетной мускулатуры при регенерации. ДАН СССР 98 : 653, 1954.
- З а в а р з и н, А. А.: О регенерации мышечных элементов у *Allolobophora caliginosa*. Арх. анат., гист. и эмбр. 29 : 342, 1938а.
- З а в а р з и н, А. А.: О регенерации соматических мышц у рыб (*Cottus cottus*). Арх. анат., гист. и эмбр. 29 : 353, 1938б.
- И г н а т ь е в а, З. П.: Восстановление иннервации поврежденной мышцы у некоторых млекопитающих животных. Вопросы восстановления органов и тканей позвоночных животных (стр. 256). Москва 1954.
- С т у д и т с к и й, А. Н. и С т р и г а н о в а, А. Р.: Восстановительные процессы в скелетной мускулатуре. Москва 1951.
- Х е й с и н а, В. И.: Регенерация соматической мускулатуры у костистых рыб. Сборник статей памяти акад. А. А. Заварзина (стр. 147). Москва 1948.
- L a n g, K.: Lokalisation der Fermente und Stoffwechselprozesse in den einzelnen Zellbestandteilen und deren Trennung (Mikroskopische und chemische Organisation der Zelle). 2. Colloquium der Deutschen Gesellschaft für physiologische Chemie. Berlin 1952.
- R o v a t i, L., C a s t o l d i, G.: Sulla rigenerazione muscolare post-traumatica. Ricerche sperimentali. Ann. ital. chirurg. 30 : 719, 1953.
- T s u b o i, K. K., Y o k o h a m a, H. O., S t o w e l l, R. E., W i l s o n, M. E.: The Chemical Composition of Regenerating Mouse Liver. Arch. Biochem. 48 : 272, 1954.

## FOLIA BIOLOGICA

Tom. III. (1957) — Fasc. 1.

### К вопросу структуры вируса табачной мозаики

В. БЫСТРИЦКИЙ

Вирусологический институт ЧСАН, Братислава

Поступило в редакцию 24 X 1956

Поверхностная и внутренняя структура вирусных частиц табачной мозаики (далее ВТМ) является предметом уже сравнительно обширных исследований. В последнее время, напр. Schramm (1955) наблюдал в алкалической среде распад частиц ВТМ на тонкие кружочки, диаметром в  $150 \text{ \AA}$ , и толщиной в  $50\text{--}100 \text{ \AA}$ , с отверстием в центре, диаметром около  $34 \text{ \AA}$ . С помощью электронной микрофотографии ему удалось также снять волокна рибонуклеиновой кислоты, толщиной приблизительно в  $34 \text{ \AA}$ . Он полагает, что наблюдавшиеся им кружочки бывают у инактивированных частиц нанизаны на волокно рибонуклеиновой кислоты. Сухов (1953), исходя, между прочим, и из работ Герчика (1953) относительно расслабления структуры бактериофага под действием соответствующих поверхностно-активных веществ, полагает, что ему удалось, обрабатывая частицы ВТМ этиловым спиртам, сделать наглядной их спиральную структуру.

Watson (1954) и Franklin и Klug (1955) исследуют структуру ВТМ с помощью разбора дифракционного рисунка рентгеновских лучей. В своей последней работе (Franklin, Klug 1956) эти исследователи приходят к заключению, что по поверхности частиц ВТМ винтообразно проходит желобок (и соответственная грань), отвечающие спирали главной белковой цепи с подъёмом в  $23 \text{ \AA}$ . Глубина винтовой нарезки бывает около  $30 \text{ \AA}$ . Относительно грани винтовой нарезки авторы полагают, что она проходит не непрерывно, а состоит из ряда идущих друг за другом отростков, отходящих от отдельных звеньев главной спиральной цепи.

Опираясь на указанные работы Герчика и Сухова, мы хотели попытаться расслабить структуру палочек ВТМ, обрабатывая их соответственными химикалиями, и сделать изображения подобной диссоциированной структуры с помощью электронного микроскопа (причем тогда нам еще не были известны работы Franklin-а и Klug-а (1956).

#### Материалы и методы

Мы пользовались пурификатом ВТМ, приготовленным с помощью комбинированной техники пурификации путем осаждения сернокислым аммонием и скоростного центрифугирования. За предоставление очищенных образцов автор изъясняет благодарность сотрудникам института инж. Ф. Соколу и инж. Г. Рутткаю-Недецкому. Для приготовления препарата мы обрабатывали вирус в течение определенного времени и при определенной температуре этиловым спиртом (или же каким-нибудь другим веществом), после чего разводили образец дважды дистиллированной водой и наносили микрокаплю на коллоидную пленку. Высушенные препараты напылялись хромом и исследовались с помощью электронного микроскопа системы Siegbahn-Schönander.

### *Результаты и обсуждение*

Предварительные опыты при комнатной температуре с использованием ацетона, эфира, этилового спирта и мочевины не дали существенных изменений в структуре частиц, хотя у некоторых препаратов мы могли отметить известное увеличение, «разбухание» палочек под действием ацетона и этилового спирта. Результаты, о которых мы здесь докладываем, были получены путем обработки этиловым спиртом (концентрированный пурификат ВТМ и этиловый спирт в соотношении 1 : 1) и при повышенной температуре в 37 °С. Рис. 1 представляет пурификат ВТМ, который немедленно после прибавления спирта был разведен до необходимой концентрации дистиллированной водой и нанесен на коллоидную пленку. Палочки ВТМ еще не изменились. Необходимо отметить небольшие скопления мелких круглых частиц непосредственно по соседству с некоторыми палочками (рис. 2). Мы полагаем, что это — адсорбированные из среды пептидные белки, которые отделились от поверхности частиц ВТМ. Размеры этих мелких шариков бывают приблизительно несколько десятков Å. После 24-часового действия этилового спирта при 37 °С нет еще сколько-нибудь существенных изменений, хотя количество отделяющихся небольших частиц значительно повышается (рис. 3). Среди палочек ВТМ заметны вышеописанные мелкие шарики, которые под действием этилового спирта, как кажется, увеличиваются. Следующий снимок (рис. 4) показывает препарат после 48-часового действия этилового спирта при 37 °С. Отчетливо видно увеличение объема многих палочек и их распад в шарики. Можно отметить различные переходные стадии. Очевидно, что спирт действует на частицы не одинаково: у некоторых частиц увеличился только их объем и при этом стала наглядной правильность структуры поверхности, — пояса (рис. 4а); у других заметна более поздняя стадия действия спирта (рис. 4б). Местами наступает полный распад на сравнительно крупные круглые образования. Пространства между палочками ВТМ бывают покрыты большим количеством зернистого материала с шариками различных размеров.

При следующей серии опытов мы установили, что и в контрольном препарате) без спирта, т. е. подвергнувшись исключительно действию повышенной температуры в 37 °С, через 44 часа наступили заметные изменения: линейное более чем втрое удлинение палочек. При этом отчетливо выступила более или менее правильная волнистая структура их краев, свидетельствующая о неравномерном разбухании в ширину. Рис. 5 показывает 44-часовое действие спирта при 37 °С, а рис. 6 — 44-часовое действие одной только воды (также при 37 °С). На этом последнем препарате мы наблюдали распад в мелкие, круглые частицы с более темным местом в центре, представляющим, возможно, отверстие. Вдоль главной оси разбухших палочек (рис. 5 и 6) отчетливо видна более темная полоса. Трудно сказать, в какой степени это явление можно отнести на счет структуры частиц. Можно было бы предположить, что центральные части исходных частиц заполнены менее плотной массой или совсем пустые, что потом особенно выразительно проявляется при разбухании частиц. В разведенном водой пурификате ВТМ, который в течение продолжительного времени стоял в холодильнике, мы после ободостороннего напыления металлом нашли отделившиеся частицы различной величины, с отверстиями в центре (рис. 7). Следует отметить, что до сих пор нам ни на одном из препаратов не удавалось наблюдать описанные в литературе (Schramm 1955) волокна рибонуклеиновой кислоты. Для дополнения вышеизложенного приводим еще снимок в высокой степени очищенного пурификата ВТМ (рис. 8). Пурификат был разведен дистиллированной водой и немедленно нанесен на коллоидную пленку. У частиц не было заметно никакой структуры.

Мы полагаем, что нам удалось, действуя этиловым спиртом при повышенной температуре на палочки ВТМ, показать, что они подвергаются разбуханию неравномерно, и это проявляется в том, что структура палочек становится видимой. Ширина увеличенных частиц на рис. 6 достигает приблизительно

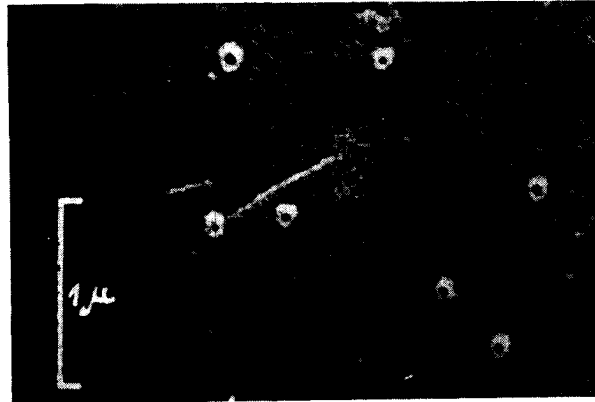


Рис. 7. Пурификат ВТМ после обоюдостороннего напыления хромом.

700 Å, т. е. она приблизительно в 4,5 раза больше нормальной ширины палочек ВТМ (как известно, 150 Å). Очевидно, что эту разницу следует приписать влиянию спирта и напыления. Ставшие видимыми пояса (рис. 4а) бывают в ширину около 100 Å. Если предположить, что и эта величина приблизительно в 4,5 раза больше истинной (хотя в направлении продольной оси палочки действие алкоголя и напыления сказывается, вероятно, по другому), — то для ширины этих поясов получается значение около 22 Å. Возможно поэтому, что нам удалось сделать непосредственно видимыми витки на поверхности палочек ВТМ, наличие которых косвенно доказано Franklin-ом и Klug-ом путем дифракционного анализа с помощью рентгена. Неправильные отростки по сторонам палочек ВТМ (рис. 5 и 6) могли бы представлять увеличенные в несколько раз под действием спирта, воды и тепла и неравномерно реагирующие на условия опыта части звеньев спирально свернутой главной белковой цепи, из которой, по мнению Franklin-а и Klug-а, состоит грань винтовой нарезки на поверхности палочек ВТМ. Отчетливо видная посредине палочки (в направлении продольной оси) полоса и круглые частицы с отверстием в центре также, вероятно, представляют реально существующие структуры палочек. Путем приблизительного измерения (точное измерение невозможно) размеров отверстий в отделяющихся частицах, как и продольной полосы на снимках 5 и 6, получаются величины, которые колеблются от нескольких десятков приблизительно до 200 Å. Можно видеть, что отделившиеся частицы и палочки ВТМ неправильно, неравномерно отвечают на действие повышенной температуры и спирта. Однако мы полагаем, что наличие этих структур можно считать доказательством того, что и в центре исходных, невидоизмененных частиц находится полость, как утверждает, напр., Caspar (1956), который на основании оценки экваториального рассеяния рентгеновских лучей ориентирующим гелем ВТМ, как и расчета густоты электронов установил, что внутри палочек ВТМ проходит полость диаметром в 19 Å.

(Табл. IX, X, XI, XII)

Л и т е р а т у р а

- С у х о в, Р. С., Н и к и ф о р о в а, Г. С.: О спиралевидном строении частиц вируса мозаики табака. ДАН СССР 90 : 674, 1953.  
C a s p a r, D. L. D.: Structure of Tobacco Mosaic Virus. Nature 177 : 928, 1956.  
F r a n k l i n, R. E., K l u g, A.: The Splitting of Layer-Lines in X-Ray Fibre Diagrams of Helical Structures: Application to Tobacco Mosaic Virus. Acta Cryst. 8 : 777, 1955.  
F r a n k l i n, R. E., K l u g, A.: The Nature of the Helical Groove on the Tobacco Mosaic Virus Particle. X-Ray Diffraction Studies. Biochim. Biophys. Acta 19 : 403, 1956.  
H e r č í k, F.: Problém bakteriofága. Praha 1953.  
S c h r a m m, G.: Über die Struktur des Tabakmosaikvirus. III. Der Zerfall in alkalischer Lösung. Z. Naturforsch. 10b : 481, 1955.  
W a t s o n, J. D.: The Structure of Tobacco Mosaic Virus. I. X-Ray Evidence of a Helical Arrangement of Sub-Units around the Long-Axis. Biochim. Biophys. Acta 13 : 10, 1954.

On the Structure of Tobacco Mosaic Virus

V. BYSTRICKÝ

*Summary*

Particles of the tobacco mosaic virus which had been exposed for 48 hours to the action of ethyl alcohol at a raised temperature of 37° C were studied by the electron microscope. On the surface regular bands, with an actual breadth of 22 Å (calculated from the swollen particles) were observed. The particles were several times enlarged by the effect of the alcohol and heat. The structures observed are considered to be identical with the surface structure of particles of the TMV (the screw-like spiral) found by Franklin and Klug (1956). In preparations exposed to the action of alcohol and also in control preparations, in which the particles of the TMV in bi-distilled water were exposed only to the action of raised temperature, fragments of particles with an opening were found, together with particles with a clearly discernible central band running in the same direction as the main axis and other particles with irregular processes protruding from the side. We are of the opinion that the openings in the fragments, and also the less electron-scattering band, in preparations of particles enlarged irregularly and several times, represent the hollow, internal part of particles of the TMV, demonstrated by an indirect method by Caspar (1956). The irregular processes might also represent enlarged sub-units of the main, twisted protein chain, of which, according to Franklin and Klug, the edge of the spiral on the surface structure of particles of the TMV is formed.

(Tables IX, X, XI, XII)



## The Question of the Conversion of Serum Globulin into Antibody by means of the Influence of an Antigen

J. ŠTERZL and Z. TRNKA

Institute of Biology, Czechoslovak Academy of Science, Department of Microbiology, Praha

*Received September 14, 1956*

Although many experiments have been carried out with amino acids, using labelled isotopes, in which it was found that antibody formation involves the formation of the protein molecule *de novo* (Gros, Coursaget and Macheboeuf 1954, Green and Anker 1954), the possibility of the conversion of the complete globulin molecule into a molecule of the character of an antibody as a result of the influence of the antigen is still postulated. These conclusions are based primarily on the experiments of Pauling (1940, 1942) with antibody formation *in vitro*. It was not possible, however, to reproduce even these experiments *in vitro* (Kuzin and Nevreava 1947, Hrubešová 1957).

Our own experiments demonstrated that the conversion of normal globulin into antibody by the influence of the antigen is impossible not only *in vitro*, but also in the organism. The protein composition of the serum was determined electrophoretically in newborn rabbits which had not yet commenced sucking. All the serum protein fractions were determined in all sera collected immediately after birth and also on subsequent days (fig. 1). These findings are in agreement with the findings of Brambell

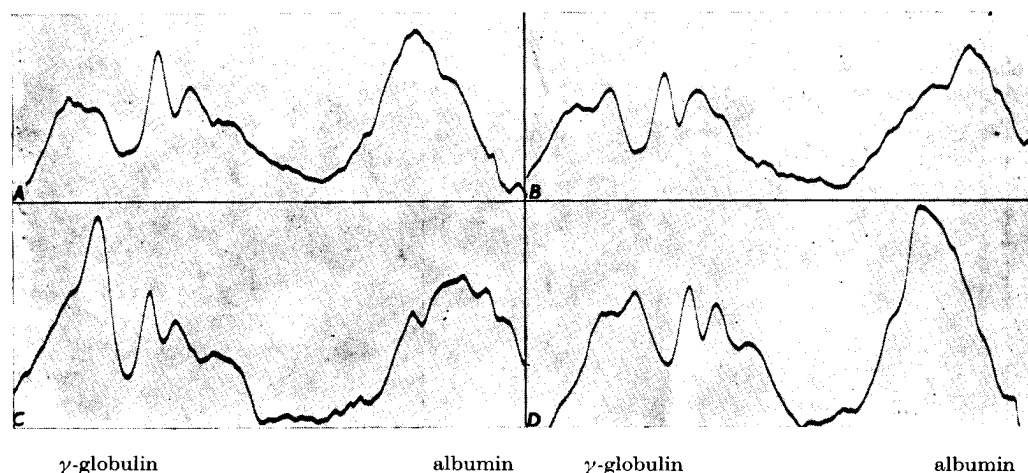


Fig 1. Electrophoresis of the sera of young rabbits collected immediately after birth. A, B, C, D: different rabbits from the same litter.

(1951, 1954) that in rabbits the serum proteins are transmitted to the young by the mother during uterine life. The injection of antigen in young rabbits in the period when their blood contains a sufficient amount of  $\gamma$ -globulin does not lead to antibody formation (fig. 2).

By injecting antigen into young rabbits whose serum contained normal  $\gamma$ -globulin, it was demonstrated that fully-formed globulins are not converted into protein molecules of the character of an antibody by the influence of the antigen, even *in vivo*.

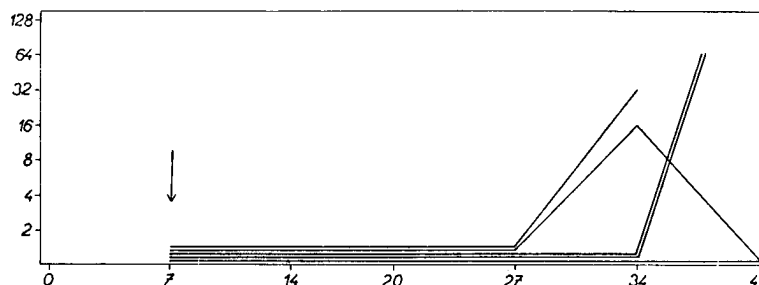


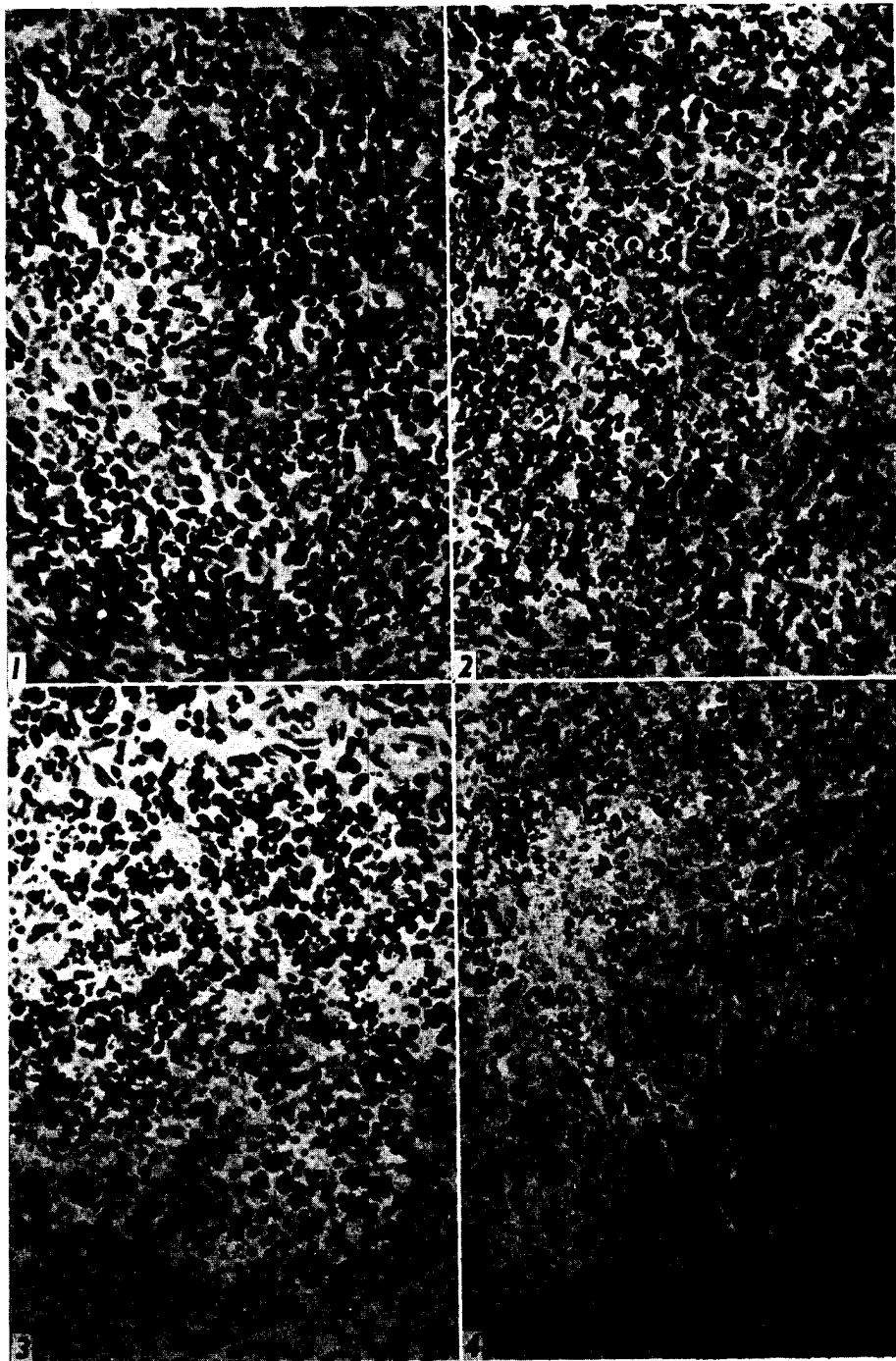
Fig. 2. Antibody formation in young rabbits following intraperitoneal injection of antigen *S. paratyphi B* ( $10^8$  micro-organisms/ml)

#### References

- Brambell, W. F. R., Hemmings, W. A., Henderson, M.: Antibodies and Embryos. London 1951.
- Brambell, R. F. W., Brierley, J., Halliday, R., Hemmings, W. A.: Transference of Passive Immunity from Mother to Young. Lancet 266 : 964, 1954.
- Green, H., Anker, H. S.: On the Synthesis of Antibody Protein. Biochim. Biophys. Acta 13 : 365, 1954.
- Gros, P., Coursaget, J., Macheboeuf, M.: Recherches sur l'existence de pré-curseurs protéiques dans la formation des anticorps. Bull. soc. Chim. biol. 34 : 1070, 1954.
- Hruběšová, M.: Příspěvek k pokusům o tvorbu protilátek in vitro. Čs. mikrobiol. 2 : 10, 1957.
- Pauling, L.: A Theory of the Structure and Process of Formation of Antibodies. J. Am. Chem. Soc. 62 : 2643, 1940.
- Pauling, L., Campbell, D. A.: The Manufacture of Antibodies in vitro. J. Exp. Med. 76 : 211, 1942.
- Кузнец, А. М., Неврева, Н. А.: К вопросу образования антител in vitro. Биохимия 12 : 49, 1947.

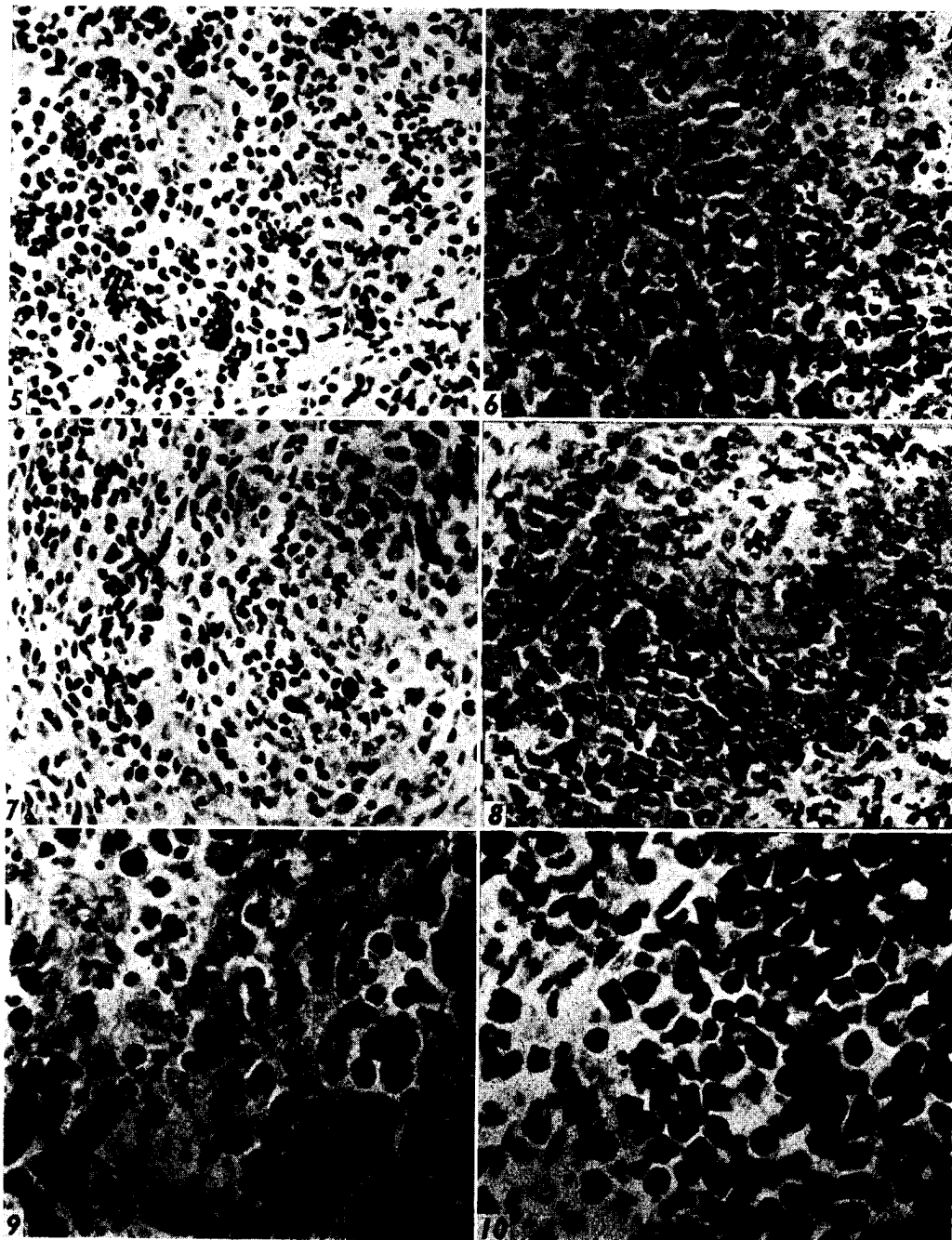
*М. Прасличка и М. Гилл:* Ранние цитологические изменения лимфоцитарной и миелоидной составных частей мышиной селезенки после рентгеновского облучения.

Табл. I.



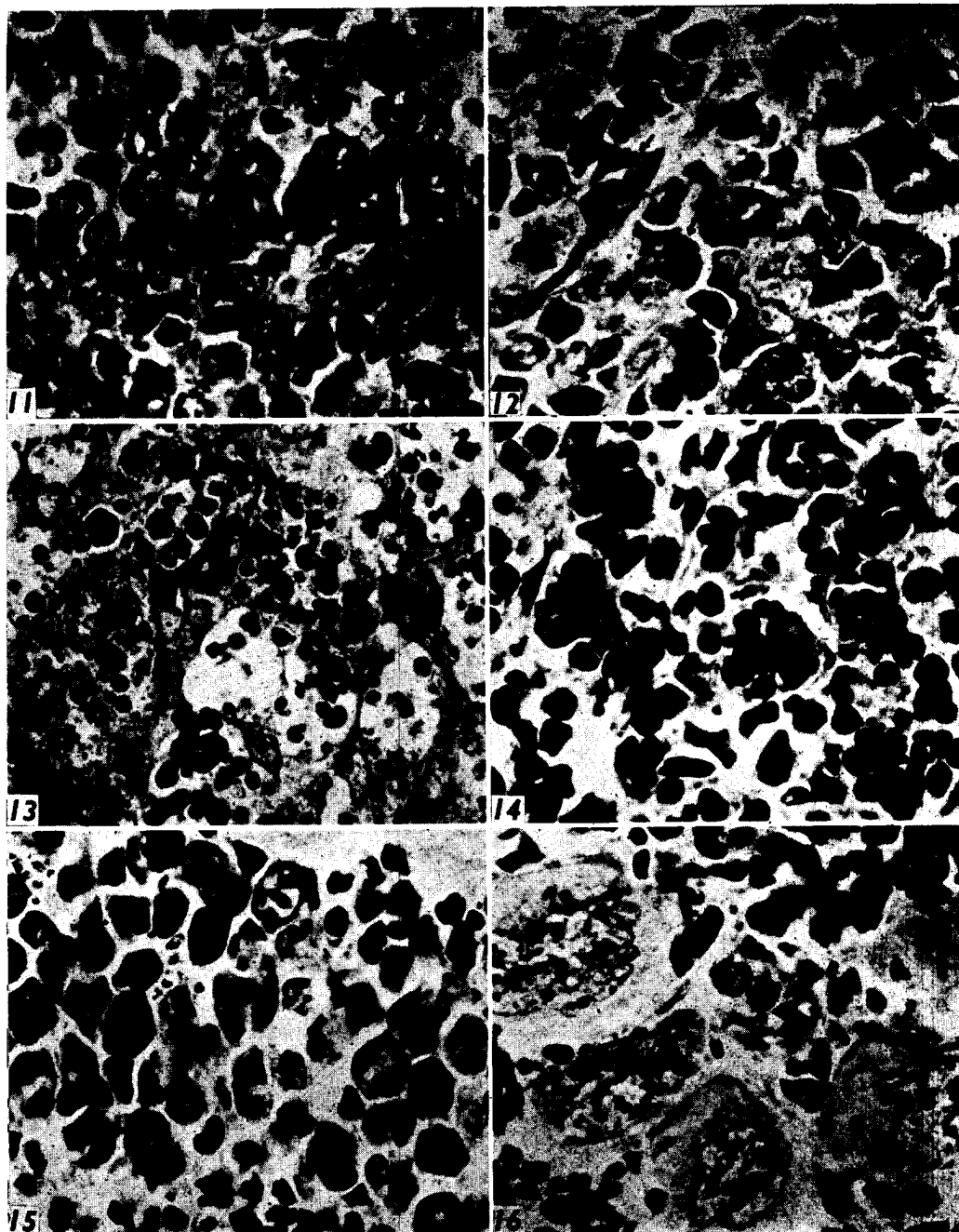
Тексты к рисункам см. стр. 47.

*М. Прасличка и М. Гилл:* Ранние цитологические изменения лимфоцитарной и миелоидной составных частей мышиной селезенки после рентгеновского облучения. Табл. II.



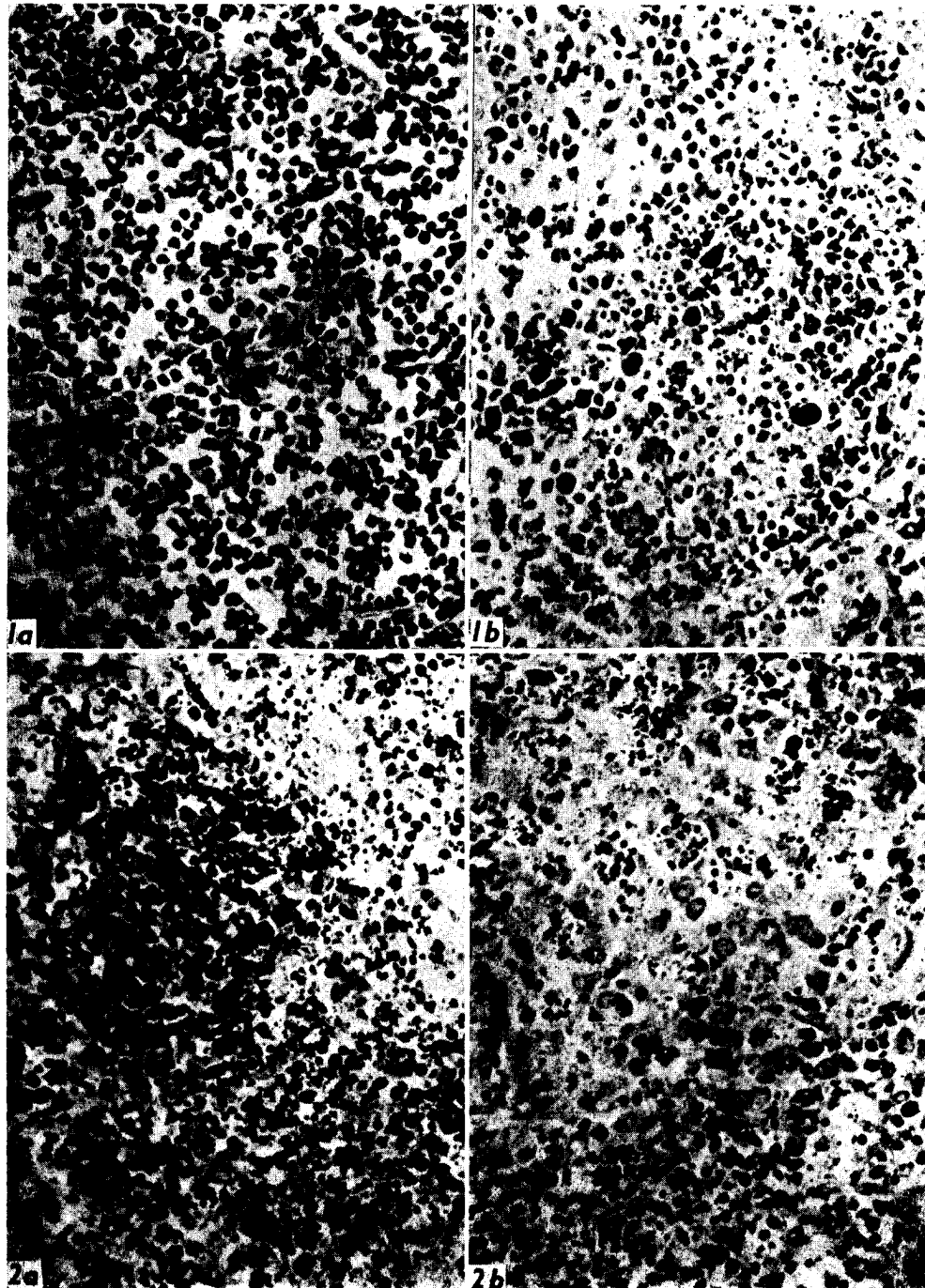
Тексты к рисункам см. стр. 48.

М. Прасличка и М. Гилл: Ранние цитологические изменения лимфоцитарной и миелоидной составных частей мышиной селезенки после рентгеновского облучения. Табл. III.



Тексты к рисункам см. стр. 48.

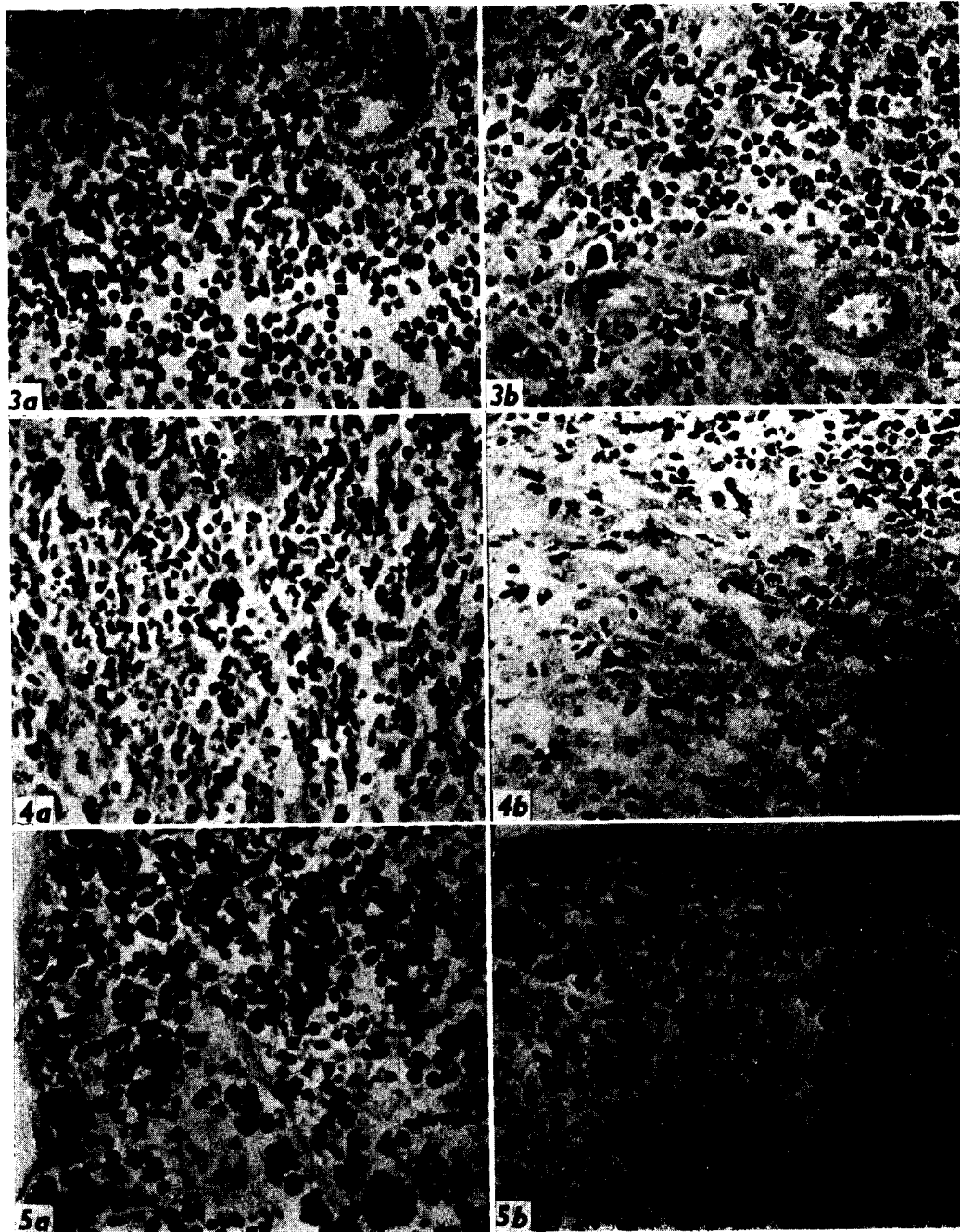
*М. Прасличка и М. Гилл:* Ранние цитологические изменения лимфоцитарной и миелоидной составных частей мышиной селезенки после рентгеновского облучения. Табл. IV.



Тексты к рисункам см. стр. 48.

*М. Прасличка и М. Гилл:* Ранние цитологические изменения лимфоцитарной  
и миелоидной составных частей мышиной  
селезенки после рентгеновского облучения.

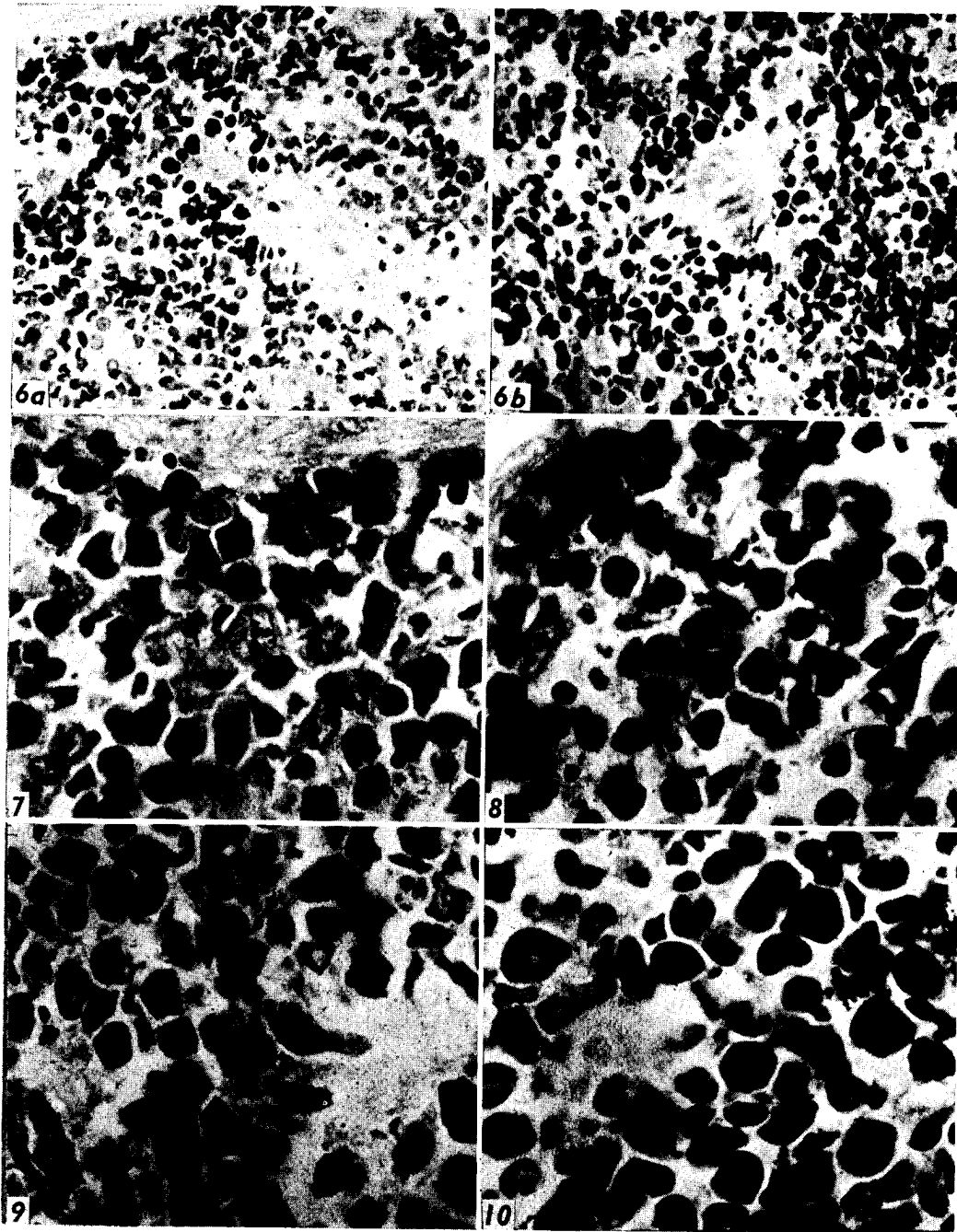
Табл. V.



Тексты к рисункам см. стр. 48.



*М. Прасличка и М. Гилл:* Ранние цитологические изменения лимфоцитарной и миелоидной составных частей мышиной селезенки после рентгеновского облучения. Табл. VI.



Тексты к рисункам см. стр. 48.



В. Пушка: К вопросу деления ядер при регенерации скелетной мышцы кролика. Табл. VII.

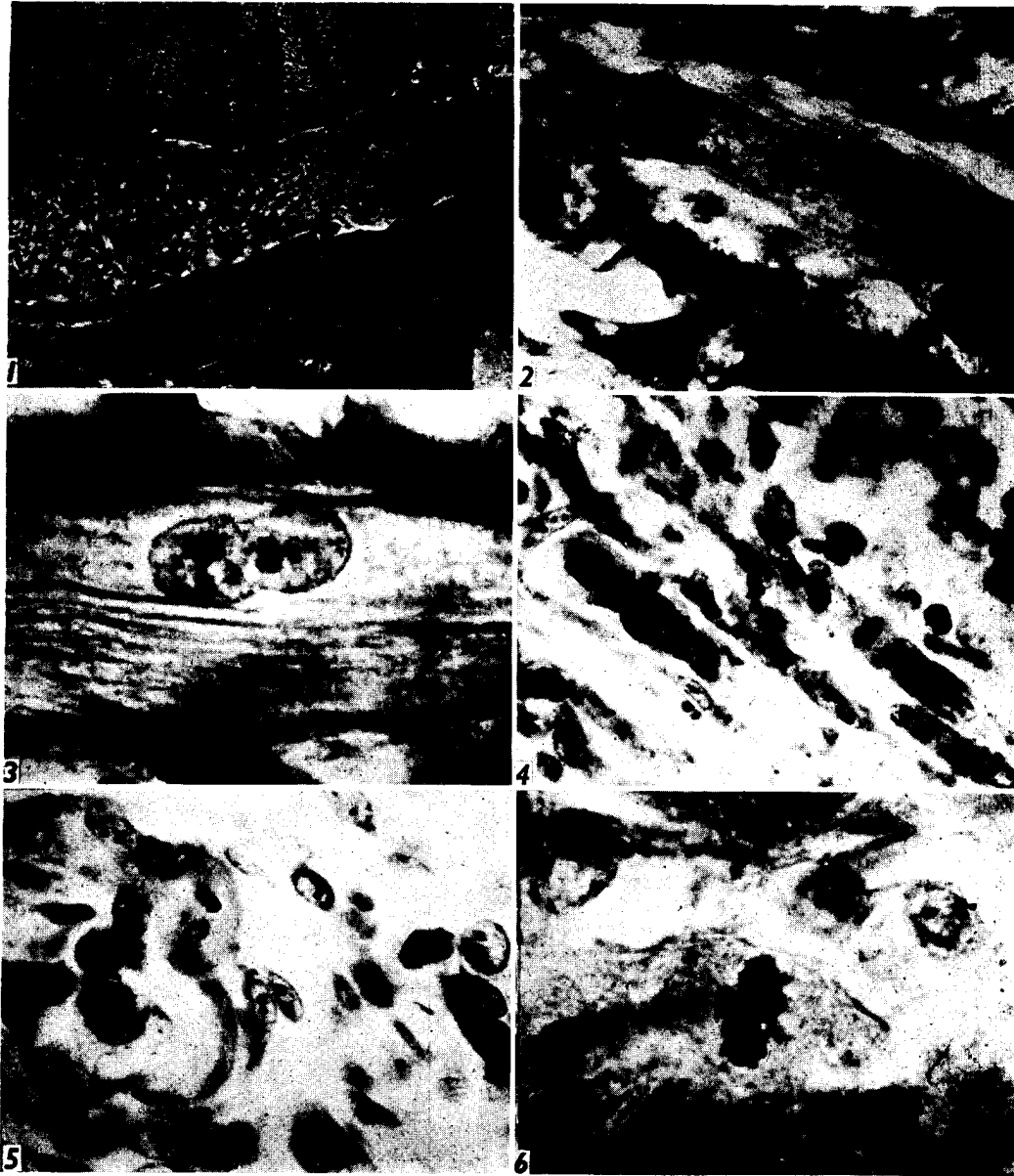


Рис. 1. Мышца кролика через 6 дней после ранения. Группа ядер как результат деления перегородкой. — Рис. 2. Мышца кролика через 6 дней после ранения. Начало образования цепочки. В конце волокна группа тесно прилегающих друг к другу ядер. — Рис. 3. Мышца кролика через 6 дней после ранения. Нормальный amitosis на периферии мышечного волокна. Рис. 4. Мышца кролика через 9 дней после ранения. К мышечным почкам прилегают мио-бласты, в которых протекает процесс митоза. — Рис. 5. Мышца кролика через 9 дней после ранения. Митозы в миоблестах на концах нарушенных мышечных волокон. — Рис. 6. Мышца кролика через 9 дней после ранения. Митозы в миоблестах.

Рис. 1—3: Фиксация формалином, окраска по van Gieson-у.

Рис. 4—6: фиксация Формалином, окраска железным гематоксилином по Гайденгайну.

*В. Пуля:* К вопросу деления ядер при регенерации скелетной мышцы кролика. Табл. VIII.

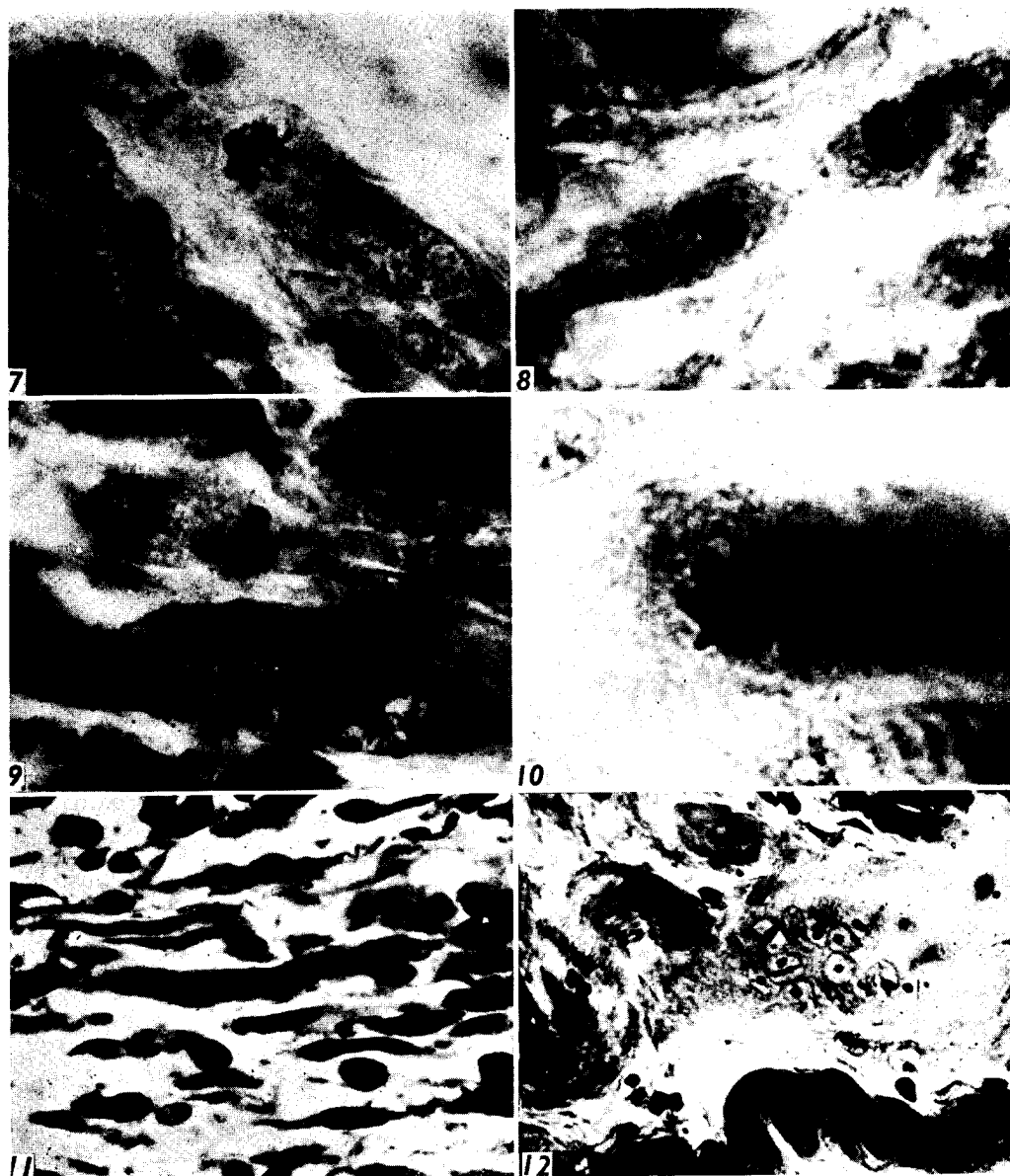


Рис. 7, 8. Мышца кролика через 9 дней после ранения. Митозы в миобластах. — Рис. 9. Мышца кролика через 9 дней после ранения. Митоз в миобласте. Деление ядра путем амитоза. Рис. 10. Мышца кролика через 9 дней после ранения. Митоз в миобласте непосредственно по соседству с мышечным волокном. — Рис. 11. Мышца кролика через 9 дней после ранения. Амитоз в миобласте (образование перегородки в ядре). Переход к примитивному (двухъядерному) симпласту. — Рис. 12. Мышца кролика через 20 дней после ранения. Расширенная часть конца мышечного волокна, содержащая ядра с отчетливо видимыми перегородками.

Рис. 7—12: Фиксация формалином, окраска железным гематоксилином по Гайденгайну.

В. Быстрицкий: К вопросу структуры вируса табачной мозаики:

Табл. IX.

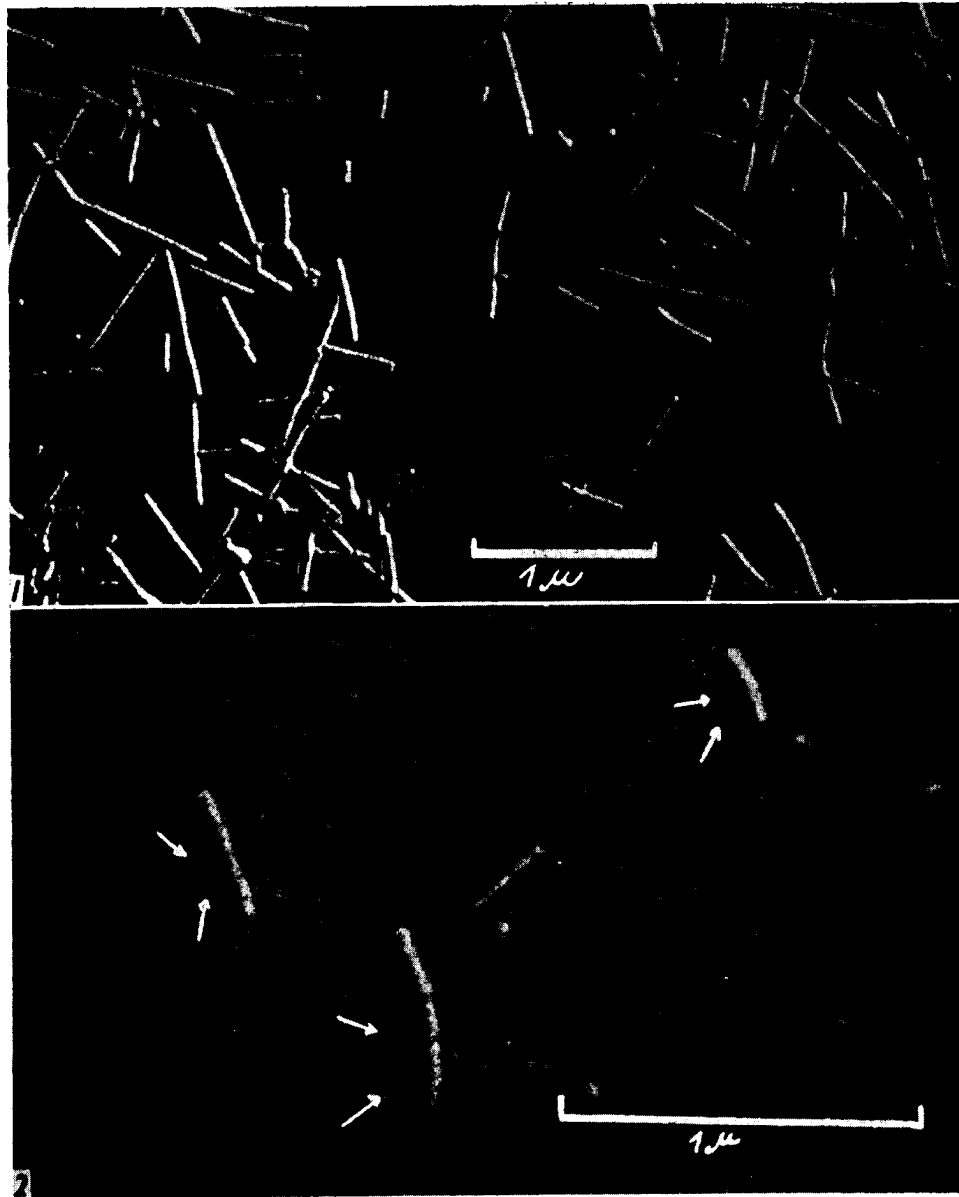


Рис. 1. Пурификат ВТМ, непосредственно после прибавления спирта разведенный дважды дистиллированной водой и нанесенный на пленку.

Рис. 2. Пурификат ВТМ как на рис. 1. Отделение балластных белков с поверхности палочек.

*В. Быстрицкий: К вопросу структуры вируса табачной мозаики.*

Табл. X.

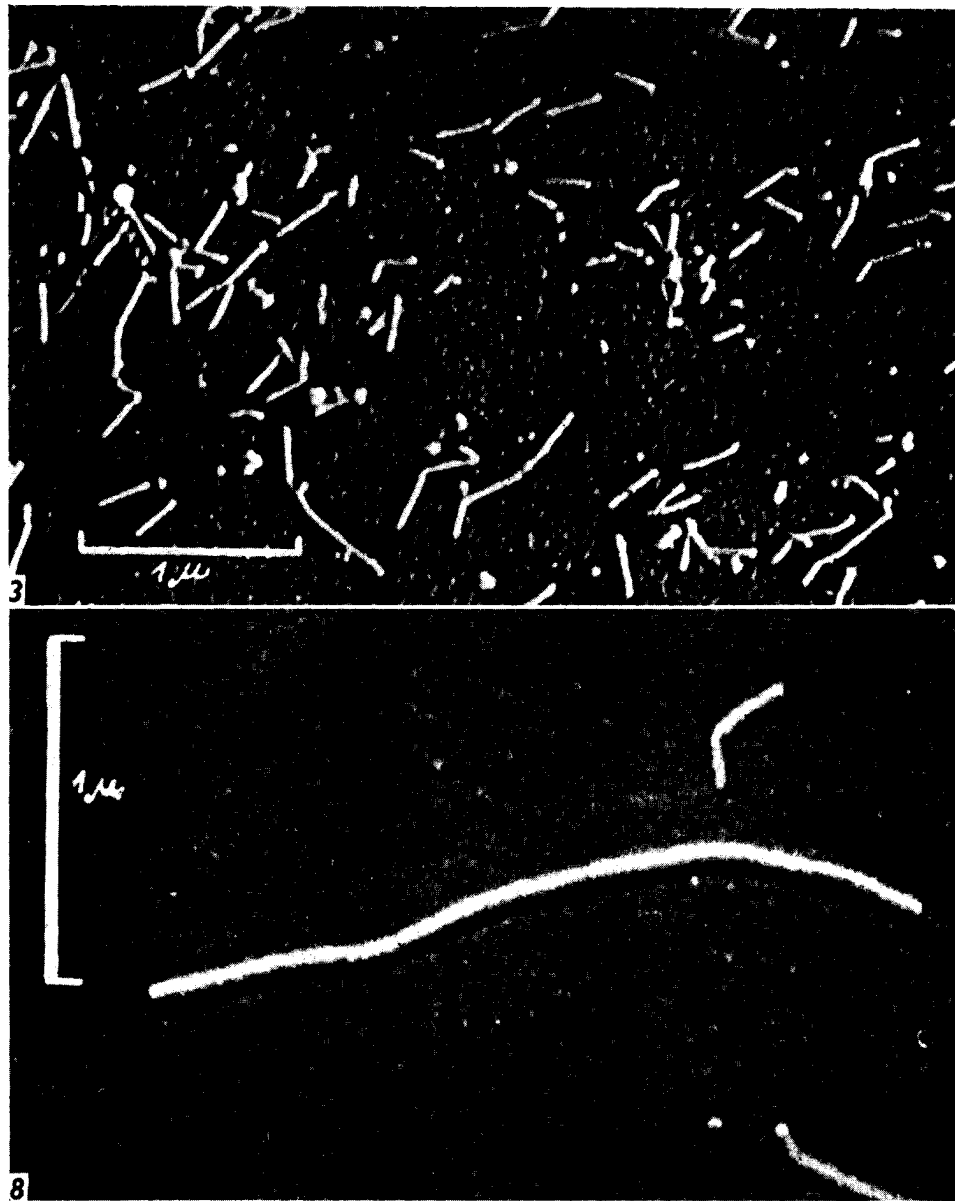


Рис. 3. Пурификат ВТМ после 24-часового действия этилового спирта при 37 °С.

Рис. 8. Налочки ВТМ из контрольного препарата.

*В. Быстрицкий:* К вопросу структуры вируса табачной мозаики.

Табл. XI.

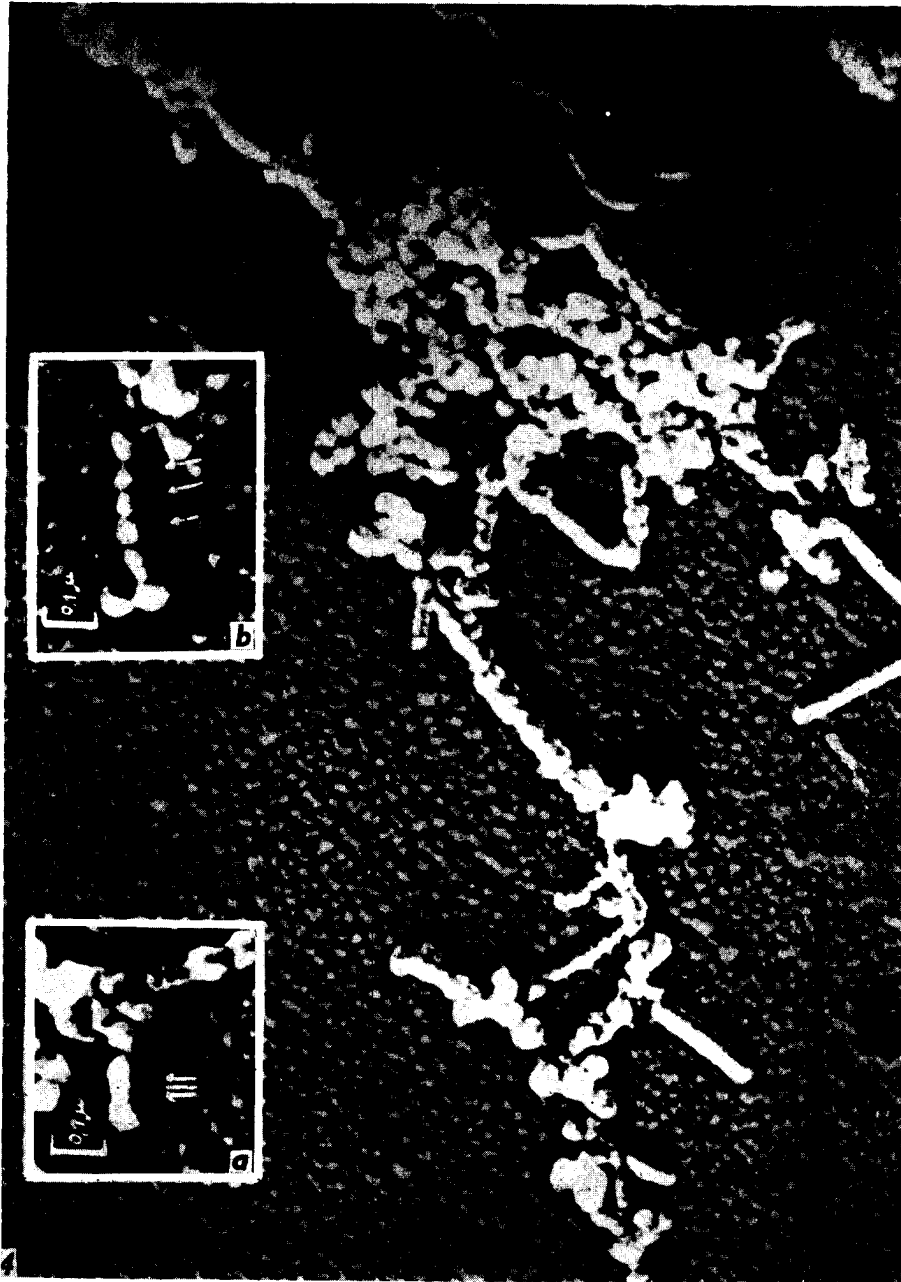


Рис. 4, а, б. Пурификат ВТМ после 48-часового действия этилового спирта при 37 °С.

В. Быстрицкий: К вопросу структуры вируса табачной мозаики.

Табл. XII.

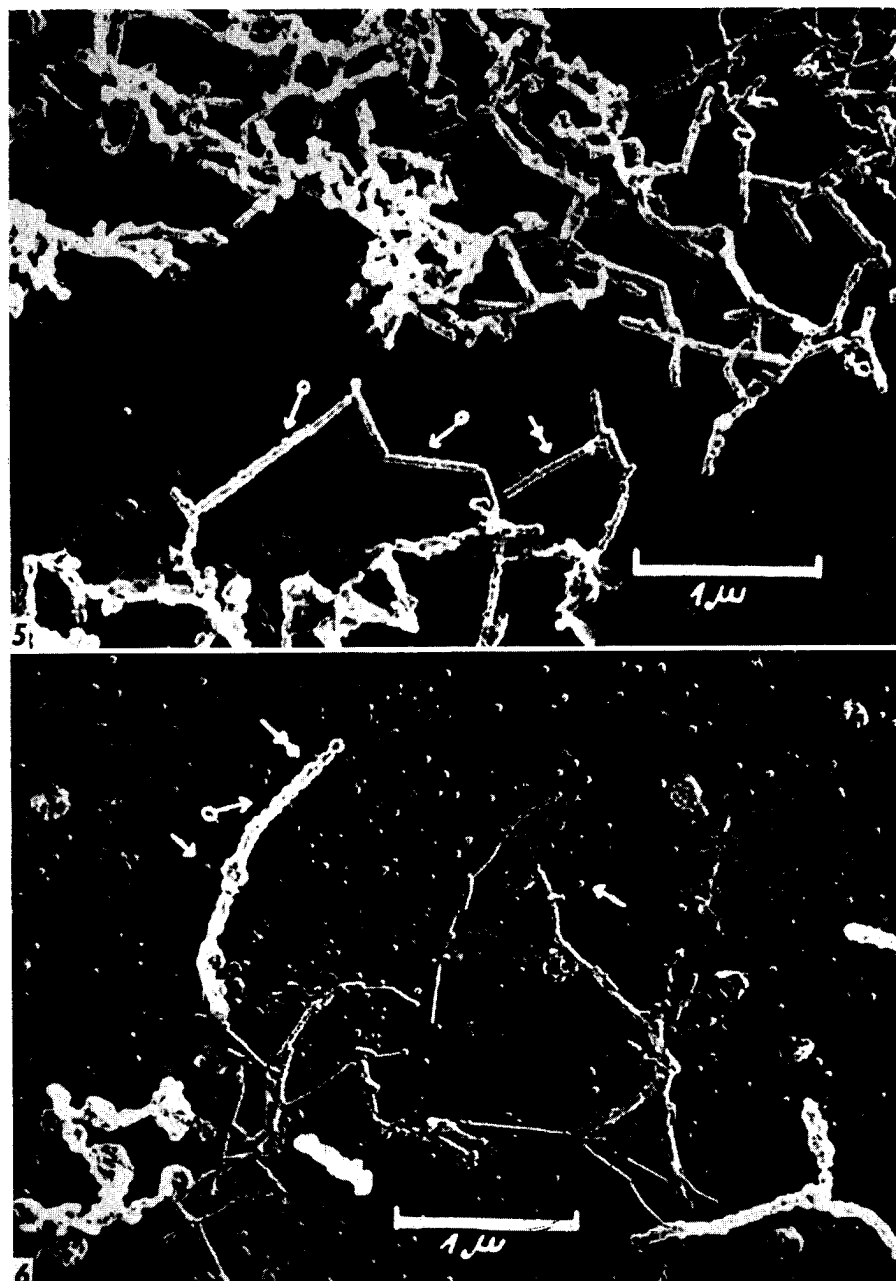


Рис. 5. 44-часовое действие этилового спирта на пурификат ВТМ при 37° С. На местах, обозначенных стрелкой  $\odot \rightarrow$ , неправильное разбухание краев палочки; стрелками  $\rightarrow \rightarrow$  обозначена внутренняя полоса в палочках.

Рис. 6. Пурификат ВТМ, разведенный дважды дистиллированной водой и подвергавшийся 44-часовому действию температуры в 37° С. Стрелками  $\odot \rightarrow \rightarrow$  обозначены такие же явления, как и на рис. 5. Стрелкой  $\rightarrow$  обозначены отделившиеся частицы с отверстием в центре.

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

INHALT

Šterzl, J.: The Production of Antibodies by Isolated Spleen Cells Following Contact with an Antigen in vitro (Штерцль, Я.: Образование антител изолированными клетками селезенки после смешения с антигеном in vitro) . . . . .	1
Johanovský, J.: The Significance of Staphylococcal $\alpha$ toxin and Leucocidin (Йогановский, Ю.: Значение стафилококкового альфа токсина и лейкоцидина) . . . . .	10
Dyr, J. and Protiva, J.: Metabolic Products During the Growth of Clostridium acetobutylicum (Дыр, И. и Протива, Ю.: Продукты обмена веществ в течение роста Clostridium acetobutylicum) . . . . .	17
Chaloupka, J.: The Influence of Ions on the Formation of Protease by the Actinomyces Streptomyces griseus (Халоупка, Ю.: Влияние ионов на образование протеазы лучистым грибом Streptomyces griseus) . . . . .	24
Herčík, F.: Photoreactivation of Bacteria Irradiated with X-rays (Герчик, Ф.: Фотоактивизация бактерий после рентгеновского облучения) . . . . .	31
Прасличка, М. и Гилл, М.: Ранние цитологические изменения лимфоцитарной и миелоидной составных частей мышиной селезенки после рентгеновского облучения (Praslička, M. and Hill, M.: Early Cytological Changes in the Lymphocyte and Myeloid Components of Mouse Spleen Following X-ray Irradiation) . . . . .	37
Hašková, V. and Hašek, M.: Increased Tolerance of Heterografts in Newborn Birds (Гашкова, В. и Гашек, М.: Повышение совместимости гетеротрансплантатов у новорожденных животных) . . . . .	49
Пужа, В.: К вопросу деления ядер при регенерации скелетной мышцы кролика . . . . .	55
Быстрицкий, В.: К вопросу структуры вируса табачной мозаики (Bystrický, V.: On the Structure of Tobacco Mosaic Virus) . . . . .	59
Краткие сообщения . . . . .	63